



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**

**«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«Ο ρόλος του mToR στον καρκίνο του θυρεοειδούς»**

**ΤΣΕΣΜΕΛΗΣ ΜΙΛΤΙΑΔΗΣ**

**ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**ΔΗΜΑΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ**, Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακολογίας Παν/μιου Θεσσαλίας (Επιβλέπων)

**ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ**, Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής Παν/μιου Θεσσαλίας (Μέλος)

**ΤΡΑΧΑΝΑ ΒΑΡΒΑΡΑ**, Επίκουρη Καθηγήτρια Κυτταρικής Βιολογίας Παν/μιου Θεσσαλίας (Μέλος)

**ΛΑΡΙΣΑ, 2016**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**

**«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»**

**«The role of mToR in thyroid cancer»**

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία αποτελεί διπλωματική εργασία στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος «Γενετική του Ανθρώπου» του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φαρμακολογίας του αντίστοιχου τμήματος.

Πριν την παρουσίαση των αποτελεσμάτων της παρούσας διπλωματικής εργασίας, αισθάνομαι την υποχρέωση να ευχαριστήσω ορισμένους από τους ανθρώπους που γνώρισα, συνεργάστηκα μαζί τους και έπαιξαν πολύ σημαντικό ρόλο στην πραγματοποίησή της.

Πρώτη από όλους, θέλω να ευχαριστήσω την υπεύθυνη καθηγήτρια για το μεταπτυχιακό πρόγραμμα κ. Ασπασία Τσέζου, που με δέχθηκε στο συγκεκριμένο πρόγραμμα σπουδών.

Επίσης, οφείλω να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα καθηγητή της διπλωματικής εργασίας, κ. Κωνσταντίνο Δήμα για την πολύτιμη καθοδήγηση του και εμπιστοσύνη που μου έδειξε στην εκπόνηση της εργασίας.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω την μετα-διδακτορική ερευνήτρια Χρυσήδα Τσιμπλούλη και την υποψήφια διδάκτορα Ευαγγελία Σερέτη, οι οποίες με τα πλούσια πνευματικά προσόντα και το ήθος τους συνέβαλαν ουσιαστικά στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.

Τέλος, δεν θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω το διευθυντή του εργαστηρίου Φαρμακολογίας, κ. Σακελλαρίδη Νικόλαο, όπως επίσης και τους λοιπούς συνεργάτες: Ασπροδίνη Ευτυχία, Μπέγα Ηλία, Πιτσικά Νικόλαο, Καραγιαννέλου Θεοδοσία, Κοτσώνη Ιωάννα και Pinar Alper για την καθοριστική τους βοήθεια στην εκπόνηση της εργασίας.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο στόχος της ραπαμυκίνης στα θηλαστικά (mammalian target of rapamycin / mTOR) είναι ένας καθοδικός τελεστής του σηματοδοτικού μονοπατιού φωσφατίδου λεινισυτόλ-3 κινάση (PI3K) / Akt, το οποίο ρυθμίζει το κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη βιωσιμότητα του κυττάρου. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη του ρόλου του mTOR ως στόχο νέων στοχεύουσων πιο αποτελεσματικών θεραπευτικών προσεγγίσεων για τον καρκίνο του θυρεοειδούς.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια των κυτταρικών σειρών 8505C και PTC και απομόνωση των πρωτεϊνών τους. Επιπλέον, για την ανάλυση των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών, πραγματοποιήθηκε ανάλυση ανοσοαποτύπωσης και ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων για τη σύγκριση των τιμών μεταξύ των δύο κυτταρικών σειρών. Τέλος, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της κυτταροτοξικότητας των αναστολέων mTOR: Everolimus, Temsirolimus, Deforolimus, XL388, AZD2014 και AZD8055 στις κυτταρικές σειρές 8505C και PTC. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι, τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών που μελετήθηκαν, ήταν μεγαλύτερα στη κυτταρική σειρά PTC συγκρινόμενα με αυτά της σειράς 8505C. Από τον έλεγχο της κυτταροτοξικότητας βρέθηκε ότι, η απαραίτητη συγκέντρωση των αναστολέων Everolimus, Temsirolimus και Deforolimus για την αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων είναι αρκετά μεγαλύτερη όταν αυτή συγκρίνεται με την απαραίτητη συγκέντρωση των αναστολέων XL388, AZD2014 και AZD8055. Επίσης, η κυτταρική σειρά PTC παρουσίασε μεγαλύτερη ανθεκτικότητα απέναντι στους αναστολείς ως προς την αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων. Από τα παραπάνω αποτελέσματα έγινε κατανοητό πως, καθώς η κυτταρική σειρά PTC εκφράζει σε μεγαλύτερο βαθμό τις συγκεκριμένες πρωτεΐνες, η ανθεκτικότητα της απέναντι σε αναστολείς του mTOR είναι υψηλότερη από την ανθεκτικότητα της κυτταρικής σειράς 8505C.

## ABSTRACT

The mammalian target of rapamycin (mTOR) protein is a downstream effector of the phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)/Akt pathway, which regulates cell proliferation and cell viability. The objective of the present study was to investigate the role of mTOR as a target for new more effective therapeutic approaches against thyroid cancer.

Initially, cell lines 8505C and PTC were cultured and proteins were abstracted from these cell lines. Furthermore, Western Blot Analysis was performed for the analysis of the expression levels of proteins and a quantification of these results was held in order to compare the values of the two cell lines. Finally, cytotoxicity assay was performed for the following inhibitors of mTOR: Everolimus, Temsirolimus, Deforolimus, XL388, AZD2014 and AZD8055 in the cell lines 8505C and PTC. The examination of the cytotoxicity results showed that, the necessary concentration of Everolimus, Temsirolimus and Deforolimus for the inhibition of cell growth is considerably more when compared with the necessary concentration of XL388, AZD2014 and AZD8055. The results from the Western Blot analysis showed that, the expression levels of the studied proteins were higher in the cell line PTC compared to those of the cell line 8505C. Also, the PTC cell line showed higher resistance against the inhibitors for cell growth inhibition. From the above results it became clear that, as the cell line PTC express those specific proteins to a greater extent, the resistance against the mTOR inhibitors is greater than the resistance of the cell line 8505C.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

---

ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
A. Καρκίνος.....	9
A.1. Εισαγωγή στην έννοια του καρκίνου.....	9
A.2. Επίπτωση και θνησιμότητα του καρκίνου.....	11
A.3. Βασικά χαρακτηριστικά ενός κακοήθους όγκου.....	11
B. Θυρεοειδής αδένας.....	15
B.1. Μορφολογία και λειτουργία του θυρεοειδούς.....	15
B.2. Καρκίνος του θυρεοειδούς.....	16
Γ. Ο ρόλος του mToR στο καρκίνο.....	20
Γ.1. Σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K-Akt-mToR.....	20
Γ.2. Βλάβες στο μονοπάτι PI3K-Akt-mToR που σχετίζονται με την καρκινογένεση.....	23
Δ. Στοχεύουσες θεραπείες .....	24
Δ.1. Νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις.....	24
Δ.2. Καρκίνος του θυρεοειδούς – Αναστολείς κινάσης τυροσίνης.....	27
Δ.3. Ραπαμυκίνη, ο πρώτος αναστολέας του μονοπατιού PI3K-Akt-mToR.....	28
Δ.4. Αναστολείς mToR πρώτης γενιάς.....	31
Δ.5. Αναστολείς mToR δεύτερης γενιάς.....	33
E. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	36
E.1. Κυτταρικές σειρές .....	36
E.2. Πρωτόκολλο καλλιέργειας κυττάρων.....	36
E.3. Κατάψυξη κυττάρων.....	37
E.4. Απόψυξη κυττάρων.....	38
E.5. Καταμέτρηση των κυττάρων.....	38
E.6. Παρασκευή Αναστολέων σε διαλυτή μορφή.....	40
E.7. Έλεγχος κυτταροτοξικότητας (SRB Assay).....	43
E.8. Εξαγωγή πρωτεϊνών από κυτταρικές σειρές.....	47
E.9. Ανάλυση Bradford.....	49
E.10. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης – SDS.....	50
E.11. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών – Western Blot.....	52
ΣΤ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	56

ΣΤ.1. Προσδιορισμός των GI50, TGI και LC50 των αναστολέων Everolimus, Temsirolimus, Deforolimus, XL388, AZD2014, AZD8055 για τις κυτταρικές σειρές 8505C και PTC με την τεχνική ανάλυσης κυτταροτοξικότητας SRB.....	56
ΣΤ.2. Προσδιορισμός και ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών mToR, phospho-mToR (Ser 2448), phospho-mToR (Ser 2481), Rictor, Raptor και Gβ1 για τις κυτταρικές σειρές 8505C και PTC.....	62
Z. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	66
H. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	70

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο καρκίνος αποτελεί αδιαμφισβήτητα μία από τις κυριότερες αιτίες θανάτου στο δυτικό κόσμο. Η ανάπτυξη του καρκίνου μπορεί να οφείλεται σε πολλούς παράγοντες, είτε γενετικούς, είτε περιβαλλοντικούς. Η εμφάνιση του απαιτεί κάποιες συγκεκριμένες αλλαγές στη δομή και λειτουργία του κυττάρου. Αυτές οι αλλαγές επηρεάζουν τον τρόπο αντίδρασης του κυττάρου σε συγκεκριμένα ερεθίσματα. Έτσι, τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν ικανότητα αθανασίας, αέναου πολλαπλασιασμού όπως επίσης και ικανότητα μετάστασης. Για να γίνει αυτό, είναι απαραίτητη η απορρύθμιση της λειτουργίας συγκεκριμένων σηματοδοτικών μονοπατιών. Στη παρούσα διπλωματική εργασία μελετάται η απορρύθμιση του μονοπατιού PI3K – Akt – mTOR που έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων αλλά και την αποφυγή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση).

Για την αντιμετώπιση του καρκίνου μέσω του προαναφερθέντος σηματοδοτικού μονοπατιού, έχουν αναπτυχθεί διάφορα μόρια/αναστολείς που προσδένονται σε συγκεκριμένα στοιχεία του σηματοδοτικού μονοπατιού και εμποδίζουν τη λειτουργία του. Πιο αναλυτικά, για την αναστολή της λειτουργία της πρωτεΐνης mTOR, έχουν αναπτυχθεί δύο κατηγορίες αναστολέων, οι αναστολείς πρώτης γενιάς και οι αναστολείς δεύτερης γενιάς. Οι πρώτοι αναστολείς που αναπτύχθηκαν ήταν οι αναστολείς πρώτης γενιάς και έχουν τη δυνατότητα να αναστέλλουν το mTOR μόνο όταν σχηματίζει ένα συγκεκριμένο σύμπλοκο (mTORC1). Οι αναστολείς δεύτερης γενιάς αναπτύχθηκαν ως μία πιο βελτιωμένη έκδοση και μπορούν να αναστέλλουν το mTOR, όποιο σύμπλοκο και αν σχηματίζει αυτό (mTORC1 και mTORC2).

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη του ρόλου του mTOR ως στόχο νέων στοχεύουσων πιο αποτελεσματικών θεραπευτικών προσεγγίσεων για τον καρκίνο του θυρεοειδούς. Έτσι μελετήθηκε η επίδραση συγκεκριμένων αναστολέων της λειτουργίας του mTOR στις θυρεοειδικές καρκινικές κυτταρικές σειρές 8505C (ATC) και PTC. Γνωρίζοντας τη σημαντικότητα του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K – Akt – mTOR στο καρκίνο του θυρεοειδούς, κρίθηκε σκόπιμο να αναζητηθεί το ποσοστό της έκφρασης και άλλων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη δημιουργία των συμπλόκων mTORC1 και mTORC2. Πιο αναλυτικά μελετήθηκαν τα επίπεδα



έκφρασης των: mToR (total), phospho - mToR (ser 2448), phospho - mToR (ser 2481), Raptor, Rictor και Gβ1.

Για την μελέτη και ανάπτυξη των παραπάνω καρκινικών κυτταρικών σειρών, πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια των κυττάρων σε φλάσκες με θρεπτικό υλικό. Στόχος της ανάπτυξης των κυττάρων ήταν η χρησιμοποίησή τους σε πειράματα έτσι ώστε να ελεγχθεί η επίδραση συγκεκριμένων αναστολέων στο ρυθμό ανάπτυξης τους. Επιπλέον, χρησιμοποιώντας τα κύτταρα των κυτταρικών σειρών, πραγματοποιήθηκε απομόνωση των πρωτεϊνών με σκοπό τον έλεγχο των επιπέδων έκφρασης συγκεκριμένων μορίων του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K – Akt – mToR. Για τον έλεγχο της επίδρασης των αναστολέων στις κυτταρικές σειρές, χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος κυτταροτοξικότητας (SRB assay). Για τη σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών, πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western Blot).

Στο πρώτο κεφάλαιο γίνεται αναφορά στα γενικά χαρακτηριστικά του καρκίνου. Αρχικά σχολιάζονται οι βασικές ιδιότητες ενός καρκινικού κυττάρου. Έπειτα γίνεται μία ιστορική αναφορά στην εμφάνιση του καρκίνου. Ακολουθεί παρουσίαση των πιο συχνών μορφών καρκίνου και των ποσοστών εμφάνισής του στο ανδρικό και γυναικείο φύλο. Τέλος ακολουθεί αναλυτική παρουσίαση των βασικών προϋποθέσεων για την ανάπτυξη ενός κακοήθους όγκου.

Στο δεύτερο κεφάλαιο πραγματοποιείται ανάλυση των βασικών χαρακτηριστικών και της μορφολογίας του θυρεοειδούς αδένου. Ακολουθεί ανάπτυξη των πιο βασικών μορφών καρκίνου του θυρεοειδούς αλλά και της θέσης προέλευσης αυτών (κύτταρα που δίνουν γένεση στον εκάστοτε καρκίνο). Επιπλέον γίνεται αναφορά στα επίπεδα εμφάνισης της κάθε μορφής καρκίνου αλλά και στα ποσοστά θνησιμότητας αυτών. Τέλος αναφέρονται συνοπτικά τα συμπτώματα, οι μέθοδοι διάγνωσης αλλά και οι τρόποι αντιμετώπισης και θεραπείας του καρκίνου του θυρεοειδούς.

Το τρίτο κεφάλαιο αναφέρεται στο ρόλο του mToR στο καρκίνο. Αρχικά γίνεται ανάλυση του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K – Akt – mToR. Στη συνέχεια, το κεφάλαιο εστιάζει πιο ειδικά στη πρωτεΐνη mToR. Αναφέρονται αναλυτικά τα σύμπλοκα που σχηματίζει αλλά και οι αλληλεπιδράσεις των μορίων ανοδικά και καθοδικά με τα σύμπλοκα αυτά. Τέλος γίνεται αναφορά στις πιθανές βλάβες του σηματοδοτικού μονοπατιού αλλά και την επίδραση αυτών στη καρκινογένεση.

Στο τέταρτο κεφάλαιο σχολιάζεται ο τομέας ‘Στοχεύουσες θεραπείες’. Αρχικά γίνεται αναφορά στις νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις που προσφέρουν νέες

δυνατότητες και ευκαιρίες στην αντιμετώπιση του καρκίνου. Στη συνέχεια, αναπτύσσεται πιο αναλυτικά η θεραπεία με αναστολείς κινάσης τυροσίνης στο καρκίνο του θυρεοειδούς. Ακολουθεί λεπτομερής ανάλυση του πρώτου αναστολέα του mToR, που ονομάζεται ραπαμυκίνη. Έπειτα ακολουθεί ανάλυση των αναστολέων mToR πρώτης και δεύτερης γενιάς.

## A. Καρκίνος

### A.1. Εισαγωγή στην έννοια του καρκίνου

Ο καρκίνος χαρακτηρίζει μία ετερογενή ομάδα ασθενειών. Μπορεί να εμφανιστεί σε οποιοδήποτε μέρος του σώματος και επηρεάζει την φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων. Τα καρκινικά κύτταρα, σε αντίθεση με τα φυσιολογικά μπορούν και:

- i) πολλαπλασιάζονται αενάως
- ii) σχηματίζουν αθανатоποιημένες κυτταρικές σειρές
- iii) έχουν την ικανότητα μετάστασης

Οι πρώτες γνωστές περιγραφές του καρκίνου εμφανίζονται σε παπύρους στην Αρχαία Αίγυπτο (Hajdu, 2011). Ο πιο παλαιός πάπυρος χρονολογείται το 1600 π.Χ. και περιέχει αναφορές περί της μορφολογίας του καρκίνου και της διαδικασίας αφαίρεσης του μέσω καυτηρίασης. Επίσης, αναφέρεται καθαρά πως δεν υπάρχει θεραπεία. Αναφορές υπάρχουν και από τον Ιπποκράτη, ο οποίος ήταν ο πρώτος που σχολίασε την ασθένεια με τον ορισμό ‘καρκίνος’. Η λέξη καρκίνος χρησιμοποιούνταν στα αρχαία ελληνικά για να δηλώσει τα καβούρια ή τις καραβίδες. Ο Ιπποκράτης χρησιμοποίησε τον συγκεκριμένο όρο πιθανότατα λόγω της μορφολογίας των προεξεχόντων προεκβολών του όγκου, η οποία προσομοίωνε το σχήμα του κάβουρα.

Οι όροι ‘καρκίνος’ και ‘όγκος’ δεν πρέπει να συγχέονται. Ένας όγκος δεν είναι απαραίτητα και καρκίνος. Η λέξη όγκος αναφέρεται κυρίως σε μία μάζα, ένα συσσωμάτωμα κυττάρων. Ο καρκίνος είναι μία επιθετική μάζα κυττάρων με ικανότητα μετάστασης. Η ανάπτυξη και εμφάνιση του καρκίνου είναι σταδιακή. Αυτό σημαίνει πως για την εγκαθίδρυση του καρκίνου τα κύτταρα του ασθενούς πρέπει να περάσουν από κάποια στάδια μέχρι την εμφάνιση του κακοήθους όγκου.

Ακολουθεί η επεξήγηση συγκεκριμένων όρων σύμφωνα με το *Εθνικό Ινστιτούτο Καρκίνου (NCI)* προς αποφυγή σύγχυσης (<http://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms>):

- **Νεόπλασμα:** Με τον όρο νεόπλασμα αναφερόμαστε σε μία νέα ανώμαλη ανάπτυξη κυττάρων. Τα κύτταρα αυτά αναπτύσσονται ταχύρρυθμα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά κύτταρα. Η ανάπτυξη του νεοπλάσματος μπορεί να οδηγήσει σε ζημία των παρακείμενων ιστών.

- Καλοήθης όγκος: Με τον όρο αυτό αναφερόμαστε στον όγκο ο οποίος είναι μη καρκινικός. Ο καλοήθης όγκος εμφανίζεται τοπικά σε συγκεκριμένο ιστό/όργανο του σώματος και δεν έχει την ικανότητα εξάπλωσης σε άλλα τμήματα του σώματος. Παρόλα αυτά μπορεί να δημιουργήσει προβλήματα στο προσβεβλημένο άτομο εάν δεν αντιμετωπιστεί, καθώς η υπέρμετρη αύξηση του μεγέθους του μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση προβλημάτων.
- Κακοήθης όγκος: Οι κακοήθεις όγκοι είναι καρκινικές νεοπλασίες. Συνήθως είναι ανθεκτικοί απέναντι σε θεραπείες και έχουν την ικανότητα μετάστασης (δηλαδή έχουν την ικανότητα μετανάστευσης σε άλλους ιστούς/όργανα του ασθενή).

Για την αποτελεσματικότερη διάγνωση αλλά και αντιμετώπιση του καρκίνου, έχει δημιουργηθεί ένα σύστημα κατάταξης και κατηγοριοποίησης του καρκίνου (<http://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/staging>). Το κάθε στάδιο του συστήματος αναφέρεται στην έκταση του καρκίνου, στο μέγεθος του όγκου, όπως επίσης και στην εξάπλωση/μετάσταση του. Γνωρίζοντας το στάδιο του καρκίνου, ο γιατρός μπορεί να:

- i) Κατανοήσει την σοβαρότητα της ασθένειας και τις πιθανότητες επιβίωσης του ασθενή
- ii) Σχεδιάσει πιο αποτελεσματικά την θεραπεία
- iii) Προτείνει κλινικές δοκιμές που να “ταιριάζουν” με το προφίλ του ασθενούς

Αν και υπάρχουν αρκετά συστήματα κατηγοριοποίησης, το πιο χρησιμοποιημένο είναι το σύστημα TNM. Το σύστημα TNM εξετάζει τρεις μεταβλητές:

- Το T (Tumor) αναφέρεται στο μέγεθος και την έκταση του κύριου όγκου. Ο κύριος όγκος ονομάζεται πρωτογενής όγκος.
- Το N (Number of nodes) αναφέρεται στον αριθμό των κοντινών λεμφαδένων που έχουν προσβληθεί από καρκίνο.
- Το M (Metastasis) αναφέρεται στο, εάν ο καρκίνος έχει κάνει μετάσταση. Αυτό σημαίνει ότι, ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί από τον πρωτογενή όγκο σε άλλα μέρη του σώματος.

Για την αξιολόγηση των παραπάνω παραμέτρων, δίπλα από κάθε γράμμα, τοποθετείται και ένας αριθμός ο οποίος υποδηλώνει το στάδιο κάθε κατηγορίας.

## **A.2. Επίπτωση και θνησιμότητα του καρκίνου**

Ο καρκίνος θεωρείται αδιαμφισβήτητα μία από τις ασθένειες με τα μεγαλύτερα ποσοστά νοσηρότητας και θνησιμότητας παγκοσμίως καθώς σύμφωνα με το *World Cancer Report 2014* το 2012, 14 εκατομμύρια άτομα εμφάνισαν καρκίνο ενώ 8,2 εκατομμύρια απεβίωσαν λόγω αυτού (Stewart and Wild, 2014).

Στον αντρικό πληθυσμό σύμφωνα με το *World Cancer Report 2014*, οι 5 πιο συχνές μορφές καρκίνου για το 2012 (με φθίνουσα κατάταξη) ήταν:

- i ) Καρκίνος του πνεύμονα (16.7%)
- ii) Καρκίνος του προστάτη (15.0%)
- iii) Καρκίνος του παχέος εντέρου (10.0%)
- iv) Καρκίνος του στομάχου (8.5%)
- v) Καρκίνος του ήπατος (7.5%)

Στον γυναικείο πληθυσμό, οι 5 πιο συχνές μορφές καρκίνου για το 2012 ήταν:

- i ) Καρκίνος του μαστού (25.2%)
- ii) Καρκίνος του παχέος εντέρου (9.2%)
- iii) Καρκίνος του πνεύμονα (8.7%)
- iv) Καρκίνος του τραχήλου της μήτρας (7.9%)
- v) Καρκίνος του στομάχου (4.8%)

## **A.3. Βασικά χαρακτηριστικά ενός κακοήθους όγκου**

Με την ανάπτυξη της Μοριακής Βιολογίας και της Γενετικής, έχει γίνει πλέον αποδεκτό πως για την εμφάνιση και εγκαθίδρυση του καρκίνου, είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθούν συγκεκριμένες αλλαγές στο γενετικό υλικό των υπονήφιδων κυττάρων, έτσι ώστε να οδηγηθούν στην απορρύθμιση των λειτουργιών τους και τελικά στην εμφάνιση του καρκίνου. Οι αλλαγές αυτές μπορεί να σχετίζονται με διάφορες λειτουργίες του κυττάρου όπως η ανάπτυξη, η διαφοροποίηση, και η απόπτωση. Έπειτα από έρευνες στο γενετικό υλικό των καρκινικών κυττάρων βρέθηκε πως, συγκεκριμένα γονίδια (ονόματι πρωτο-ογκογονίδια και

ογκοκατασταλτικά γονίδια) υπόκεινται σε τροποποιήσεις γνωστές ως μεταλλάξεις. Πιο συγκεκριμένα, τα πρωτο-ογκογονίδια τροποποιούνται αυξάνοντας τον ρυθμό λειτουργίας τους (μεταλλάξεις κέρδους λειτουργίας - Gain of function) με τελικό αποτέλεσμα την μετατροπή τους σε ογκογονίδια. Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια τροποποιούνται με αποτέλεσμα την μείωση ή ακόμη και την εξάλειψη της λειτουργίας τους (Loss of function).

Η μετατροπή των φυσιολογικών κυττάρων δεν είναι μία διαδικασία η οποία είναι αποτέλεσμα μίας και μοναδικής τροποποίησης αλλά προαπαιτεί την ενεργοποίηση/απενεργοποίηση πολλών μηχανισμών. Σύμφωνα με τους *Douglas Hanahan και Robert A. Weinberg (2000)*, η μετατροπή των φυσιολογικών κυττάρων σε καρκινικά κύτταρα προϋποθέτει έξι ουσιώδεις αλλαγές:

- **Αυτάρκεια σε αυξητικά σήματα:** Τα φυσιολογικά κύτταρα χρειάζονται μιτογόνα αναπτυξιακά σήματα/παράγοντες έτσι ώστε να αρχίσουν την διαίρεση. Οι παράγοντες αυτοί προσδένονται στους μεμβρανικούς υποδοχείς των κυττάρων, δίνοντας σήμα για την έναρξη του πολλαπλασιασμού. Κύτταρα τα οποία έχουν υποστεί μεταλλάξεις (συνήθως σε ογκογονίδια) οδηγούνται σε μόνιμη ενεργοποίηση των υποδοχέων του κυττάρου. Έτσι το κύτταρο δέχεται συνεχόμενα σήματα για αντιγραφή με αποτέλεσμα η διαδικασία του πολλαπλασιασμού να συνεχίζει αενάως.
- **Μη απόκριση σε σήματα ανασταλτικά της κυτταρικής αύξησης:** Οι αντιαυξητικοί παράγοντες είναι μόρια αναστολές οι οποίοι συνδέονται στους μεμβρανικούς υποδοχείς των κυττάρων και αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό τους. Με την πρόσδεση τους, ενεργοποιούν ένα μονοπάτι, το οποίο οδηγεί στην έκφραση ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Τα γονίδια αυτά εμποδίζουν το κύτταρο να εκκινήσει την αντιγραφή διατηρώντας το σε μία σταθερή φάση. Μεταλλάξεις, είτε στους υποδοχείς του κυττάρου, είτε στα ογκοκατασταλτικά γονίδια, έχουν σαν αποτέλεσμα το κύτταρο να διαφεύγει της σταθερής φάσης και να αντιγράφεται αενάως.
- **Αποφυγή της απόπτωσης:** Η ανάπτυξη κακοήθους όγκου δεν εξαρτάται μόνο από την ικανότητα του κυττάρου να πολλαπλασιάζεται. Το κύτταρο πρέπει να ξεπεράσει το στάδιο του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση). Το πρόγραμμα της απόπτωσης βρίσκεται σχεδόν σε όλα τα κύτταρα. Η ενεργοποίηση του οδηγεί το κύτταρο σε συγκεκριμένες μεταβολές

όπως στη συρρίκνωση του, στη κατάτμησή του πυρήνα, στον κατακερματισμό των χρωμοσωμάτων και στην αποδόμηση του με την μορφή κυστιδίων. Η απόπτωση ενεργοποιείται από μηχανισμούς που ανιχνεύουν ανωμαλίες και βλάβες στο DNA. Απορρύθμιση αυτών των μηχανισμών οδηγεί σε αποφυγή της απόπτωσης ακόμη και αν έχουν συσσωρευτεί βλάβες στο γενετικό υλικό.

- **Απεριόριστο Δυναμικό Αντιγραφής:** Αναφέρθηκε προηγουμένως πως, αυξητικοί, αντιαυξητικοί και αποπτωτικοί παράγοντες επηρεάζουν την αντιγραφή και επιβίωση του κυττάρου. Παρόλα αυτά το κύτταρο έχει ένα συγκεκριμένο δυναμικό αντιγραφής. Αυτό σημαίνει πως, έπειτα από κάποιο κύκλο αντιγραφών, το κύτταρο θα χάσει την δυνατότητα αντιγραφής και θα μπει στη φάση της κυτταρικής γήρανσης (Senescence). Ο μηχανισμός που πυροδοτεί αυτήν την αλλαγή κρύβεται στα τελομερή. Τα τελομερή είναι τμήματα DNA που βρίσκονται στα άκρα κάθε χρωμοσώματος. Ο διπλασιασμός των χρωμοσωμάτων σε κάθε κύκλο οδηγεί στη σταδιακή μείωση των τελομερών. Έπειτα από κάποιον αριθμό αντιγραφών, τα τελομερή συρρικνώνονται σε μεγάλο βαθμό. Τότε, ενεργοποιείται το πρόγραμμα της κυτταρικής γήρανσης και το κύτταρο χάνει την ικανότητα αντιγραφής. Στα καρκινικά κύτταρα ενεργοποιείται ένα εξειδικευμένο ένζυμο, η τελομεράση, η οποία αποτρέπει την σμίκρυνση των τελομερών. Έτσι, στο καρκινικό κύτταρο, η διαίρεση του δεν μπορεί να εμποδιστεί ανεξαρτήτως του αριθμού των αντιγραφών που έχει πραγματοποιήσει.
- **Συνεχής Αγγειογένεση:** Το οξυγόνο και τα θρεπτικά συστατικά που παρέχονται από το αγγειακό σύστημα είναι απαραίτητα για την επιβίωση και την ανάπτυξη των κυττάρων. Τα καρκινικά κύτταρα, λόγω του μεγάλου δυναμικού πολλαπλασιασμού, έχουν αυξημένες ενεργειακές απαιτήσεις, όπου το παρών σύστημα δεν μπορεί να ικανοποιήσει. Για να υπερπηδηθεί αυτός ο φραγμός, τα καρκινικά κύτταρα οδηγούν σε αγγειογένεση κοντά στην περιοχή του όγκου, με αποτέλεσμα την συνεχή τροφοδοσία του όγκου με τα απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία και οξυγόνο.
- **Διήθηση του γειτονικού ιστού και μετάσταση:** Είναι γνωστό πως με το πέρασμα του χρόνου, τα κύτταρα του πρωτογενούς όγκου αποκτούν μεταστατικές ιδιότητες, δηλαδή αποκτούν την ικανότητα να μεταναστεύουν

από το σημείο δημιουργίας του όγκου σε νέα όργανα ή ιστούς. Εκεί, αρχίζουν και πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα, δίνοντας γένεση σε νέους όγκους.

Το 2011 οι *Douglas Hanahan* και *Robert A. Weinberg* δημοσίευσαν ένα άρθρο το οποίο περιείχε τέσσερα νέα συμπληρωματικά κριτήρια απαραίτητα για την ανάπτυξη του καρκίνου.

- **Απορρύθμιση των κυτταρικών ενεργειακών πηγών:** Παρατηρείται τροποποίηση του μεταβολισμού των κυττάρων. Ενεργοποιείται εναλλακτικό μονοπάτι στο οποίο επικρατεί ο αναερόβιος μεταβολισμός.
- **Αποφυγή της ανοσιακής καταστροφής:** Τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν την ικανότητα να αποφεύγουν την αναγνώριση από το αμυντικό σύστημα του οργανισμού, επιτρέποντας τα να επιβιώνουν.
- **Όγκο-επαγόμενη φλεγμονή:** Τα φλεγμονώδη κύτταρα του όγκου προωθούν την καρκινογένεση και μετάσταση.
- **Γενομική αστάθεια και μεταλλάξεις:** Μεταλλάξεις στα επιδιορθωτικά γονίδια (όπως το PARP ή το p53) προκαλούν απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου όπως επίσης και σταδιακή συσσώρευση μεταλλάξεων σε σημαντικά γονίδια για την επιβίωση του κυττάρου. Έτσι, ενώ φυσιολογικά η ανάπτυξη ενός τέτοιου κυττάρου θα έπρεπε να διακόπτεται, κάτι τέτοιο δεν συμβαίνει και το κύτταρο συνεχίζει να αναπτύσσεται παρόλα τα προβλήματα του.



Εικόνα 1: Τα 10 ορόσημα του καρκίνου

(<https://antisensescienceblog.wordpress.com/2014/07/17/hallmarks-of-cancer/>)



## **B. Θυρεοειδής αδένας**

### **B.1. Μορφολογία και λειτουργία του θυρεοειδούς**

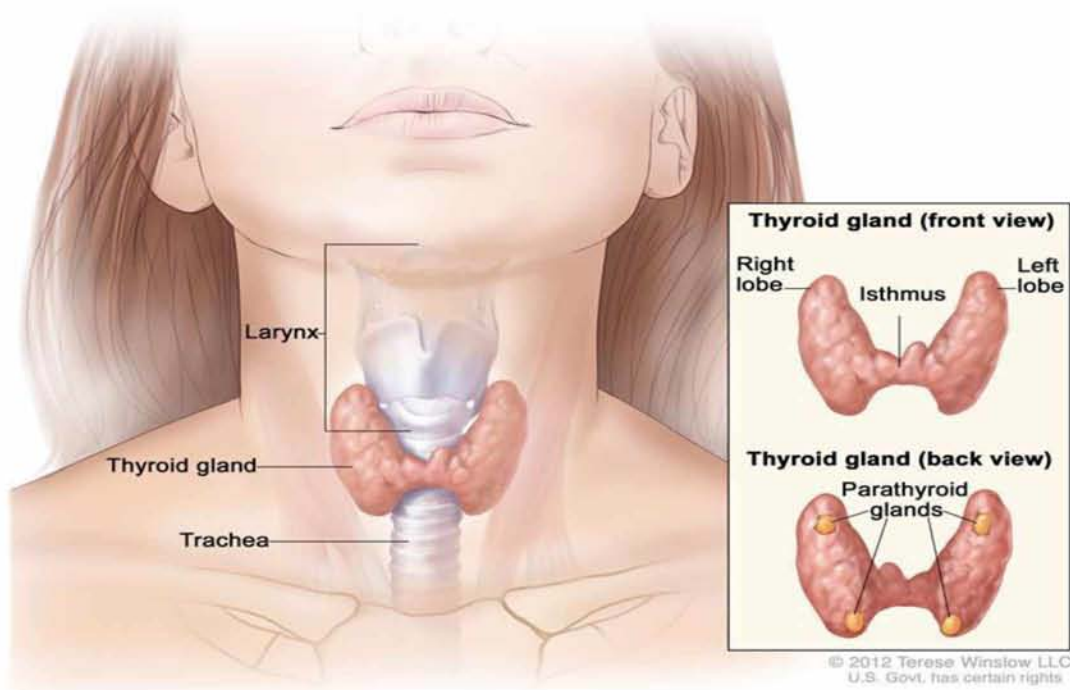
Ο θυρεοειδής αδένας είναι ένας από τους μεγαλύτερους ενδοκρινείς αδένες του σώματος. Έχει σχήμα πεταλούδας και αποτελείται από δύο συνδεδεμένους λοβούς. Βρίσκεται στο πρόσθιο τμήμα του λαιμού, κοντά στο λάρυγγα. Είναι υπεύθυνος για την παραγωγή πρωτεϊνών, για τον έλεγχο της χρήσης πηγών ενέργειας, όπως επίσης και για την ρύθμιση της ευαισθησίας του σώματος σε συγκεκριμένες ορμόνες (Cummings et al, 1998).

Ο θυρεοειδής αδένας αποτελείται από τριών διαφορετικών ειδών κύτταρα:

- i) τα θυλάκια, τα οποία είναι υπεύθυνα για την απορρόφηση ιωδίου από το αίμα, με σκοπό την παρασκευή συγκεκριμένων ορμονών
- ii) τα θυλακιώδη κύτταρα, τα οποία καλύπτουν τα θυλάκια με μία στρώση των κυττάρων τους και είναι υπεύθυνα για την έκκριση της τριωδοθυρονίνης (T3) και της θυροξίνης (T4)
- iii) τα παραθυλακιώδη κύτταρα, τα οποία βρίσκονται διασκορπισμένα στα θυλακιώδη κύτταρα και είναι υπεύθυνα για την έκκριση της καλσιτονίνης. Η καλσιτονίνη ρυθμίζει την ομοιόσταση του ασβεστίου.

Οι ορμόνες του θυρεοειδούς παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού μεταβολισμού, στον πολλαπλασιασμό και στη διαφοροποίηση των κυττάρων. Οι 2 βασικές μορφές των ορμονών του θυρεοειδούς είναι η τριωδοθυρονίνη (T3) και η θυροξίνη (T4) (Rasool et al, 2014). Τα επίπεδα έκφρασης των ορμονών αυτών ρυθμίζονται από την θυροτροπίνη (thyrotropin/thyroid-stimulating hormone/TSH). Η TSH παράγεται από τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης και η έκφραση της ρυθμίζεται από την ορμόνη απελευθέρωσης της θυροτροπίνης (thyrotropin-releasing hormone/TRH), η οποία παράγεται από τον υποθάλαμο (Boron and Boulapep, 2012)

## Anatomy of the Thyroid and Parathyroid Glands



Εικόνα 2: Θυρεοειδής Αδένας

(<http://www.cancer.gov/images/cdr/live/CDR719086-750.jpg>)

## B.2. Καρκίνος του θυρεοειδούς

### Επίπτωση και τη θνησιμότητα:

Ο καρκίνος του θυρεοειδούς μπορεί να χαρακτηριστεί ως καρκίνος με μειωμένη θνησιμότητα. Σύμφωνα με το *Εθνικό Ινστιτούτο Καρκίνου (NCI)*, τα ποσοστά επιβίωσης ατόμων που πάσχουν από καρκίνο του θυρεοειδούς έπειτα από 5 χρόνια φτάνουν έως και το 98% ([http://www.cancer.gov/types/thyroid/hp/thyroid-treatment-pdq#link/\\_1](http://www.cancer.gov/types/thyroid/hp/thyroid-treatment-pdq#link/_1)). Ανάλυση των δεδομένων για τα έτη 2010 – 2012 έδειξαν πως περίπου το 1,1% του πληθυσμού εμφάνισαν καρκίνο του θυρεοειδούς(<http://seer.cancer.gov/statfacts/html/thyro.html>).

Ο καρκίνος του θυρεοειδούς μπορεί να δημιουργηθεί είτε από τα θυλακιώδη είτε από τα παραθυλακιώδη κύτταρα. Ο καρκίνος, προερχόμενος από τα παραθυλακιώδη κύτταρα, ονομάζεται μυελοειδής καρκίνος του θυρεοειδούς (Medullary Thyroid Cancer – MTC). Ο καρκίνος προερχόμενος από τα θυλακιώδη κύτταρα χωρίζεται σε τρεις μεγάλες κατηγορίες (Marotta et al, 2015):

- i) στο διαφοροποιημένο καρκίνο (DTC)
- ii) στον πτωχώς διαφοροποιημένο καρκίνο (PDTC)

iii) στον αναπλαστικό καρκίνο (ATC)

Η κατηγορία των διαφοροποιημένων καρκίνων αποτελείται και αυτή με τη σειρά της από 2 κατηγορίες:

- i) Θηλώδης καρκίνος του θυρεοειδούς (Papillary Thyroid Cancer-PTC)
- ii) Θυλακιώδης καρκίνος του θυρεοειδούς (Follicular thyroid Cancer-FTC)

Η πλειονότητα των ασθενών με καρκίνο του θυρεοειδούς απαρτίζεται από τις δύο μορφές των διαφοροποιημένων καρκινωμάτων (PTC και FTC) σε ποσοστό έως και 90%. (Marotta et al, 2015). Τα πτωχώς διαφοροποιημένα καρκινώματα, το αναπλαστικό καρκίνωμα και το μυελοειδές καρκίνωμα καλύπτουν το υπόλοιπο ποσοστό.

### Συμπτώματα:

Τα συμπτώματα στο καρκίνο του θυρεοειδούς μπορούν σπάνια να παρατηρηθούν από τον ασθενή κατά τα πρώτα στάδια της ανάπτυξης του και συνήθως γίνονται αντιληπτά μόνο όταν το μέγεθος του όγκου έχει αυξηθεί αρκετά (<http://www.thyroidcancer.eu/en/symptoms>). Παρακάτω παρατίθενται τα πιο συχνά συμπτώματα στο καρκίνο του θυρεοειδούς (<http://www.cancer.org/cancer/thyroidcancer/detailedguide/thyroid-cancer-signs-symptoms>):

- *Εξόγκωμα στο λαιμό, το οποίο αυξάνεται γρήγορα*
- *Πρήξιμο στο λαιμό*
- *Πόνος στο μπροστινό μέρος του λαιμού που μπορεί να φτάσει μέχρι τα αυτιά*
- *Βραχνάδα ή άλλες φωνητικές αλλαγές που επιμένουν και δεν υποχωρούν*
- *Δυσκολία στην κατάποση*
- *Αναπνευστικά προβλήματα*

### Διάγνωση:

Για την διάγνωση του καρκίνου του θυρεοειδούς ο γιατρός μπορεί να προτείνει μία πληθώρα εξετάσεων (<http://www.thyroidcancer.eu/en/symptoms-and-diagnosis/diagnosis>)

- *Ψηλάφηση (ελέγχοντας το πρόσθιο τμήμα του λαιμού): Ο γιατρός αγγίζει το λαιμό, προσπαθώντας να αισθανθεί αν ο θυρεοειδής είναι διευρυμένος*

- *Εξετάσεις αίματος:* Τα επίπεδα αίματος αναλύονται στο εργαστήριο, προκειμένου να καθοριστεί αν ο θυρεοειδής λειτουργεί σωστά και αν τα επίπεδα των ορμονών στο σώμα είναι φυσιολογικά, αυξημένα ή χαμηλότερα από το συνηθισμένο.
- *Υπέρηχος:* Ένα υπερηχογράφημα στο λαιμό χρησιμοποιεί ηχητικά κύματα για να δημιουργήσει μια εικόνα του θυρεοειδικού ιστού και να ανιχνεύσει ανώμαλες αλλαγές εφόσον υπάρχουν.
- *Απομόνωση κυττάρων μέσω βελόνας:* Ο γιατρός εισάγει μια λεπτή βελόνα στο οζίδιο για την εξαγωγή κυττάρων ή υγρού
- *Βιοψία:* Πραγματοποιείται αφαίρεση ενός μικρού τμήματος του ιστού και μελέτη του στο μικροσκόπιο
- *Μοριακή ανάλυση δεδομένων:* Πραγματοποιείται ανάλυση του DNA για την εύρεση μεταλλάξεων, οι οποίες μπορούν να βοηθήσουν στην διάγνωση του καρκίνου
- *Σάρωση του σώματος:* Εάν ο γιατρός ανιχνεύσει οζίδια στο θυρεοειδή, τότε μπορεί να προτείνει ολική σάρωση του σώματος. Η σάρωση παρέχει μία πιο λεπτομερή εικόνα του θυρεοειδούς και επιτρέπει στον ιατρό να πάρει τις κατάλληλες αποφάσεις.

### Θεραπεία:

- *Χειρουργική επέμβαση:* Η χειρουργική αφαίρεση του νοσούντος τμήματος του θυρεοειδούς και η εξέταση του αποτελεί καθιερωμένη ιατρική πρακτική. Συνήθως, ο χειρουργός αφαιρεί όλον το θυρεοειδή (ολική θυρεοειδεκτομή) έτσι ώστε να διασφαλίσει ότι ο καρκίνος έχει αφαιρεθεί πλήρως. Μερικές φορές, αφαιρείται μόνο ένα τμήμα του θυρεοειδούς (λοβεκτομή ή ήμιθυρεοειδεκτομή). Η απόφαση συνήθως λαμβάνεται κατά τη διάρκεια της χειρουργικής επέμβασης.
- *Θεραπεία ραδιενεργού ιωδίου:* Ακόμη και μετά την επιτυχημένη εγχείρηση, μια μικρή ποσότητα του θυρεοειδικού ιστού συνήθως παραμένει. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ο χειρουργός πρέπει να είναι προσεκτικός ώστε να μην βλάψει γειτονικά όργανα. Καθώς ο θυρεοειδής είναι ο μόνος ιστός στο σώμα που διακατέχει ιώδιο, εφαρμόζεται μια διαδικασία που ονομάζεται αφαιρετική θεραπεία με ραδιενεργό ιώδιο. Αυτή η διαδικασία εκτελείται για

να βρει και να καταστρέψει τυχόν υπολείμματα των κυττάρων του ιστού ή του όγκου που παραμένουν στο σώμα. Η χορήγηση του ραδιενεργού ιωδίου οδηγεί στην καταστροφή αυτών των κυττάρων.

- *Ορμονική Θεραπεία:* Η ορμονική θεραπεία με χάπια μπορεί να επιτελέσει δύο σκοπούς. Πρώτον, μπορεί να βοηθήσει στη διατήρηση του φυσιολογικού μεταβολισμού του σώματος έπειτα από την αφαίρεση του θυρεοειδούς, αντικαθιστώντας τις εκλιπούσες ορμόνες. Δεύτερον, μπορεί να βοηθήσει στην αναστολή της ανάπτυξης των εναπομεινάντων καρκινικών κυττάρων (μέσω της μείωσης των επιπέδων της TSH)  
(<http://www.cancer.org/cancer/thyroidcancer/detailedguide/thyroid-cancer-treating-general-info>).

## Γ. Ο ρόλος του mToR στο καρκίνο

### Γ.1. Σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K-Akt-mToR

Το μονοπάτι PI3K-Akt-mToR αποτελεί ένα σηματοδοτικό μονοπάτι που παρουσιάζει πολύ μεγάλο ενδιαφέρον καθώς σχετίζεται ταυτόχρονα με πολλές λειτουργίες όπως η αντιγραφή και η απόπτωση. Το mToR (στόχος της ραπαμυκίνης - mammalian target of rapamycin) είναι ένας καθοδικός τελεστής του PI3K (φωσφατιδιλνισιτολ-3 κινάση)/Akt μονοπατιού. Το μονοπάτι αυτό φυσιολογικά ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό και την βιωσιμότητα των κυττάρων. Στα κύτταρα του θυρεοειδούς είναι επίσης υπεύθυνο για την πρόσληψη ιωδίου με σκοπό την παραγωγή των θυρεοειδικών πρωτεϊνών τριιωδοθυρονίνη (T3) και θυροξίνη (T4) (Souza et al, 2011).

Η πρωτεΐνη mTOR είναι μία κινάση σερίνης – θρεονίνης που λειτουργεί ως αισθητήρας για τα επίπεδα του ATP και των αμινοξέων. Ο ρόλος του mToR είναι η ρύθμιση και ισορρόπηση των επιπέδων της κυτταρικής ανάπτυξης και της διαθεσιμότητας των θρεπτικών στοιχείων (Dennis et al, 2001). Το mTOR αποτελεί το βασικό συστατικό δύο διακριτών πολυπρωτεϊνικών συστημάτων που ρυθμίζουν διαφορετικά σημεία του σηματοδοτικού μονοπατιού: το mTORC1 (mTOR σύμπλεγμα 1) και mTORC2 (mTOR σύμπλεγμα 2).

#### mTORC1:

Το mTORC1 αποτελείται από τις εξής πρωτεΐνες:

- mTOR,
- Raptor (regulatory-associated protein of mTOR)
- mLST8 (επίσης γνωστό ως GBL)
- PRAS40

Το mTORC1 είναι υπεύθυνο για την φωσφορυλίωση καθοδικά της πρωτεΐνης S6K1 (p70 πρωτεϊνική ριβοσωμική S6 κινάση 1 - P70S6K) και του παράγοντα 4EBP1 (πρωτεΐνη δέσμευσης του ευκαρυωτικού παράγοντα έναρξης της μετάφρασης 4E (eIF4E)) (Yang and Guan, 2007). Σε φυσιολογικές συνθήκες, η S6K1 και ο 4EBP1 είναι συνδεδεμένοι πάνω στον eIF3 (ευκαρυωτικός παράγοντας έναρξης 3) και διατηρούνται απενεργοποιημένοι (Holz and Blenis, 2005). Κάτω από τα κατάλληλα

ερεθίσματα, το mTOR συνδέεται στον eIF3 και φωσφορυλιώνει την S6K1 και τον 4EBP1.

Η φωσφορυλίωση της S6K1 οδηγεί στην απελευθέρωση της από τον eIF3 και τελικά στην ενεργοποίησή της. Η ενεργοποιημένη S6K1 προωθεί την έναρξη της μετάφρασης πρωτεϊνών και της ανάπτυξης των κυττάρων μέσω της φωσφορυλίωσης συγκεκριμένων κυτταρικών υποστρωμάτων (Thomas, 2002).

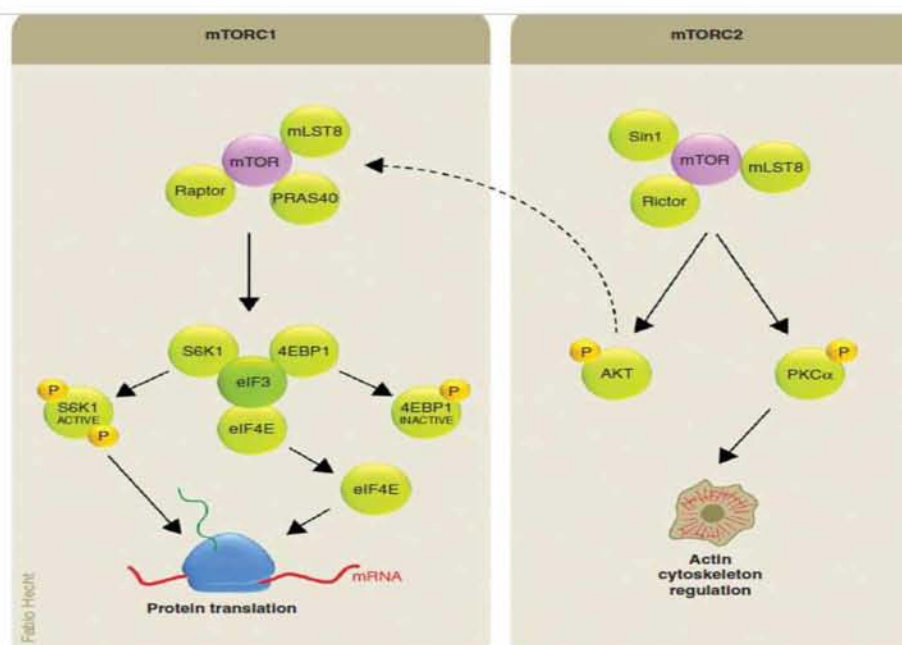
Ο 4EBP1 αναστέλλει την μετάφραση του mRNA μέσω της σύνδεσής του με τον μεταφραστικό παράγοντα eIF4E (Gingras et al, 2001). Η φωσφορυλίωση του 4EBP1 από το mTOR οδηγεί στην αποσύνδεσή του από τον eIF4E, οδηγώντας στην ενεργοποίηση του eIF4E και στην έναρξη της μετάφρασης.

### MTORC2:

Το mTORC2 σύμπλοκο αποτελείται από τα:

- mTOR,
- Rictor
- Sin 1
- mLST8

Το mTORC2 ρυθμίζει κυρίως τον κυτταροσκελετό της ακτίνης, μέσω της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) (Jacinto et al, 2004). Επιπλέον το mTORC2 μπορεί να ενεργοποιήσει την κινάση Akt/PKB φωσφορυλιώνοντάς την στην σερίνη 473 (Sarbasov et al, 2005).

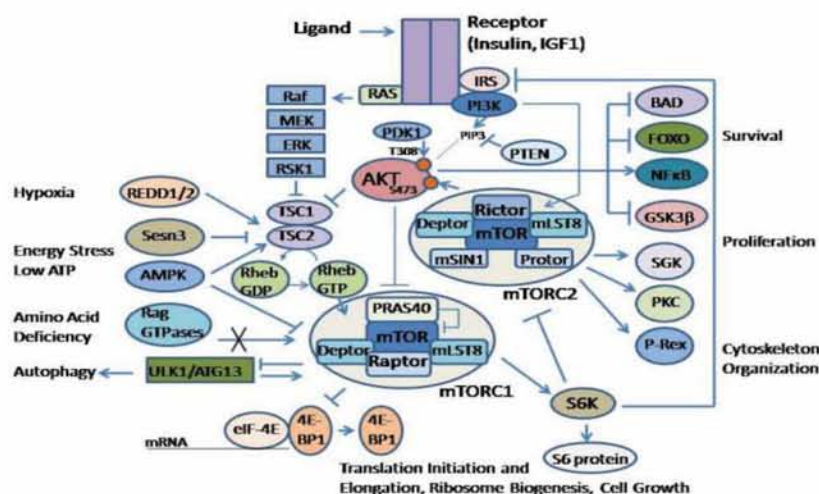


Εικόνα 3: Αλληλεπίδραση των συμπλόκων mTORC1 και mTORC2 (Souza et al, 2011)



Τα σύμπλοκα mTORC1 και mTORC2 μαζί με τις πρωτεΐνες PI3K και Akt αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, ρυθμίζοντας τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών στα κύτταρα. Αρχικά, η PI3K μπορεί να ενεργοποιηθεί είτε από υποστρώματα υποδοχών ινσουλίνης (IRSs) είτε από υποδοχείς G-συνδεδεμένων πρωτεϊνών (G-protein-coupled receptors) (Saji and Ringel, 2010). Επιπλέον, η πρωτεΐνη PTEN (Phosphatase and tensin homolog) μπορεί να απενεργοποιήσει την PI3K. Η PTEN είναι μία πρωτεΐνη με δράση φωσφατάσης, η οποία αφαιρεί μία φωσφορική ομάδα από τα φωσφοινοσιτιδία με αποτέλεσμα την απενεργοποίηση του PI3K (Paes and Ringel, 2008).

Η ενεργοποιημένη PI3K οδηγεί στην στρατολόγηση πρωτεϊνών όπως η 3-φωσφοινοσιτο-ανεξάρτητη πρωτεϊνική κινάση-1 (PDK-1) και η πρωτεϊνική κινάση B (Akt). Η Akt μπορεί να ενεργοποιηθεί πλήρως μόνο με την φωσφορυλίωση της σε δύο θέσεις, στην σερίνη 473 και στη θρεονίνη 308. Η φωσφορυλίωση επάγεται από το mTORC2 και την PDK-1 αντίστοιχα (Sarbassov et al, 2005). Η ενεργοποιημένη Akt έπειτα φωσφορυλιώνει το mTOR στην σερίνη 2448 οδηγώντας στην ενεργοποίηση του συμπλόκου mTORC1 (Navé et al, 1999), αν και μία νέα έρευνα ισχυρίζεται πως το mTOR φωσφορυλιώνεται στη σερίνη 2448 και από τη p70s6 κινάση (Chiang and Abraham, 2005). Το mTORC1, με τη σειρά του, οδηγεί στην ενεργοποίηση του eIF4E και της S6K1 με τελικό αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης των πρωτεϊνών. Πάντως, έχει βρεθεί πως, η ενεργοποίηση της S6K1 δημιουργεί μία αρνητική ανάδραση σε όλον τον μηχανισμό. Η S6K1 οδηγεί στην πρωτεασωμική αποδόμηση του IRS με αποτέλεσμα να μειώνεται η ενεργοποίηση του PI3K (Takano et al, 2001).



Εικόνα 4: Ανασκόπηση του μονοπατιού PI3K-Akt-mToR (Altomare and Khaled, 2012)



## **Γ.2. Βλάβες στο μονοπάτι PI3K-Akt-mToR που σχετίζονται με την καρκινογένεση**

Όπως έχει γίνει κατανοητό, το μονοπάτι PI3K-Akt-mToR απαρτίζεται από μία πλειάδα πρωτεϊνών οι οποίες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Οι αντιδράσεις αυτές μπορούν να οδηγήσουν είτε στην ενεργοποίηση είτε στην απενεργοποίηση του στόχου κάθε πρωτεΐνης. Βλάβες, είτε άμεσα σε αυτές, είτε στον μηχανισμό σύνθεσης τους (για παράδειγμα μεταλλάξεις στο γονίδιο υπεύθυνο για την σύνθεση της πρωτεΐνης), είναι ικανές να οδηγήσουν σε σημαντικά λάθη και απορρύθμιση του όλου μηχανισμού δράσης τους. Αν και το μεγαλύτερο ποσοστό των μεταλλάξεων επιδιορθώνεται άμεσα από τον οργανισμό, υπάρχει η πιθανότητα κάποιες από αυτές να μην διορθωθούν. Αποτέλεσμα της μη επιδιόρθωσης είναι η διατήρηση και διαιώνιση των μεταλλάξεων στην επόμενη γενιά κυττάρων. Ανάλογα με το είδος και τη θέση της μετάλλαξης, ο βαθμός επικινδυνότητας του προβλήματος μεταβάλλεται. Καθώς το μονοπάτι PI3K-Akt-mToR ρυθμίζει την έκφραση των πρωτεϊνών, την ανάπτυξη και επιβίωση του κυττάρου, γίνεται κατανοητό πως πιθανές βλάβες σε αυτό το σύστημα μπορούν να οδηγήσουν σε πολύ σημαντικά προβλήματα όπως στην ανάπτυξη καρκίνου (Nicholson and Anderson, 2002).

Σε πολλούς μορφές καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου του θυρεοειδούς, παρατηρείται υπερενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/Akt λόγω γενετικών αλλοιώσεων (Yuan and Cantley, 2008). Ένας από τους πιο σημαντικούς καθοδικούς στόχους του μονοπατιού PI3K/Akt είναι η πρωτεΐνη mToR. Μεταλλάξεις στο mToR απορυθμίζουν τον μηχανισμό, υπερενεργοποιώντας την παραγωγή πρωτεϊνών με αποτέλεσμα την εμφάνιση κακοηθειών. Επίσης, μεταλλάξεις στο PI3KCA οδηγούν στην απορρύθμιση του μηχανισμού και σε πολλές περιπτώσεις παρατηρείται η ανάπτυξη όγκου. Το PI3KCA ανήκει στην οικογένεια των PI3Ks και είναι υπεύθυνο για την ενεργοποίηση καθοδικών στόχων του μονοπατιού. Μεταλλάξεις κέρδους λειτουργίας στο PI3KCA οδηγούν σε υπερλειτουργία του μονοπατιού (Wu et al, 2005).

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, το ογκοκατασταλτικό γονίδιο PTEN είναι υπεύθυνο για την παραγωγή μίας φωσφατάσης, η οποία δρα αρνητικά στο μονοπάτι αναστέλλοντας τη δράση του PI3K. Μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας του PTEN οδηγούν σε αύξηση της λειτουργικότητας του μονοπατιού με πιθανό αποτέλεσμα την εμφάνιση καρκίνου (Sansal and Sellers, 2004).

## Δ. Στοχεύουσες Θεραπείες

### Δ.1. Νέες Θεραπευτικές Προσεγγίσεις

Είναι γνωστό πως ο καρκίνος αποτελεί μία αιτία θανάτου με εξαιρετικά υψηλά ποσοστά στο δυτικό κόσμο. Μετά την διάγνωση, μία ποικιλία θεραπειών μπορεί να εξεταστεί. Η επιλογή της θεραπείας εξαρτάται από τον τύπο του καρκίνου και το βαθμό εξέλιξης της νόσου. Οι τρεις βασικές στρατηγικές που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία του καρκίνου είναι οι: χειρουργική επέμβαση, ακτινοθεραπεία και χημειοθεραπεία. Αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν, είτε μόνες τους, είτε σε συνδυασμό μεταξύ τους (Hermant et al, 2014).

Τις δύο τελευταίες δεκαετίες, οι ερευνητές εστιάζουν στην ανάπτυξη διαφορετικών στρατηγικών για τη θεραπεία του καρκίνου, έτσι ώστε η θεραπεία να είναι πιο αποτελεσματική. Οι προσεγγίσεις περιγράφονται παρακάτω:

- Αναστολή του μεταβολισμού των καρκινικών κυττάρων: Μερικές φορές, τα καρκινικά κύτταρα εισέρχονται σε μια κατάσταση γνωστή ως κυτταρική γήρανση. Σε αυτή την κατάσταση, τα καρκινικά κύτταρα είναι ανενεργά και δεν είναι ικανά να πολλαπλασιαστούν. Όταν τα καρκινικά κύτταρα εισέρχονται σε κατάσταση κυτταρικής γήρανσης, τείνουν να αυξάνουν τα ποσοστά μεταβολισμού της ενέργειας και γενικά τις ενεργειακές τους απαιτήσεις. Αυτό συμβαίνει διότι, όταν τα κύτταρα εισέρχονται στην κατάσταση της γήρανσης, παράγουν μεγάλες ποσότητες πρωτεϊνών-αγγελιοφόρων που διασπώνται από τα καρκινικά κύτταρα. Η διαδικασία της διάσπασης είναι απαιτητική σε ενέργεια. Αναστολή του μεταβολισμού των καρκινικών κυττάρων οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο (Dörr et al, 2013).
- Θεραπεία με μονοκλωνικά αντισώματα: Τα συγκεκριμένα μονοκλωνικά αντισώματα έχουν σχεδιαστεί έτσι ώστε να προσκολλώνται σε συγκεκριμένους στόχους που βρίσκονται μόνο σε καρκινικά κύτταρα. Τα πρώτα μονοκλωνικά αντισώματα, Rituximab και Trastuzumab, εγκρίθηκαν στις Ηνωμένες Πολιτείες στη δεκαετία του 1990. Μέχρι το 2014, 12 μονοκλωνικά αντισώματα είχαν εγκριθεί για τη θεραπεία του καρκίνου. Ένα πρόσφατο παράδειγμα για τη θεραπεία των λεμφωμάτων αποτελεί το Brentuximabvedotin (Scott et al, 2012).
- Συσσώρευση πρωτεΐνης που οδηγεί στο κυτταρικό θάνατο: Η συσσώρευση ουβικουιτινωμένων πρωτεϊνών αποτελεί μια νέα προσέγγιση για τη θεραπεία

του καρκίνου. Τόσο ο αναστολέας της δεακετυλάσης ιστονών (HDAC), Vorinostat όσο και ο αναστολέας πρωτεάσης του HIV, Ritonavir καταστέλλουν τη δραστηριότητα της πρωτεΐνης θερμικού σοκ (HSP) 90 και αυξάνουν την ποσότητα των μη-αναδιπλωμένων πρωτεϊνών στο κύτταρο. Συνδυάζοντας έναν εξ αυτών των αναστολέων με τον αναστολέα του πρωτεασώματος, Bortezomib οδηγεί στο θάνατο των καρκινικών κυττάρων, αναστέλλοντας την αποδόμηση των μη-αναδιπλωμένων πρωτεϊνών και οδηγώντας τελικά στη συσσώρευση των ουβικουιτινωμένων πρωτεϊνών στα κύτταρα (Laemmli, 1970).

- Ενεργή Ανοσοθεραπεία: Οι ανοσοθεραπείες διεγείρουν το ανοσοποιητικό σύστημα του ασθενούς, ώστε να καταστρέψουν τα καρκινικά κύτταρα. Το 2010, ο FDA έδωσε την έγκριση για το εμβόλιο Sipuleucel-T (Provenge), το οποίο χρησιμοποιείται στη θεραπεία του ορμονοανθεκτικού καρκίνου του προστάτη. Τα εμβόλια ενεργοποιούν μια ανοσολογική απόκριση που μπορεί να προστατεύσει τους ασθενείς από πιθανή μετάσταση και υποτροπή (Scott et al, 2012).
- Θεραπεία του καρκίνου με μαγνητικά νανοσωματίδια: Τα συστήματα παράδοσης μπορούν να αξιοποιηθούν για την τροποποίηση της απελευθέρωσης των αντικαρκινικών παραγόντων, επιτρέποντας τους να παραμείνουν περισσότερο στην κυκλοφορία του αίματος. Τα συστήματα αυτά αυξάνουν την αποτελεσματικότητα και ελαχιστοποιούν την έκθεση τους στο υπόλοιπο σύστημα του οργανισμού, μειώνοντας έτσι τις παρενέργειες, το κόστος του φαρμάκου όπως επίσης και την ποσότητα του φαρμάκου που πρέπει να φορτωθεί. Η σύνδεση των παραγόντων με μαγνητικά νανοσωματίδια επιτρέπει σε εξωτερικούς μαγνήτες να μετακινούν το συζυγές φάρμακο στην περιοχή του όγκου. Έτσι η θεραπεία γίνεται στοχευμένη, ενώ παρατηρείται μείωση των παρενεργειών (Alexiou et al, 2011).
- Εξατομικευμένη Ιατρική: Διαγνωστικοί έλεγχοι της γονιδιακής έκφρασης και των βιοδεικτών των ασθενών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διαστρωμάτωση τους σε δυνητικά αποκρινόμενους και μη αποκρινόμενους ασθενείς σε συγκεκριμένη θεραπεία. Η προσέγγιση αυτή μπορεί να βοηθήσει τους ιατρούς να αποφασίσουν ποια θεραπεία πρέπει να ακολουθηθεί έτσι ώστε να αποφευχθούν οι παρενέργειες (Hermant et al, 2014).

- Θεραπεία του καρκίνου με αντι-αγγειογενετικούς παράγοντες: Ο σχηματισμός νέων αιμοφόρων αγγείων στα καρκινικά κύτταρα οδηγεί σε αγγειογένεση. Τα νέα αγγεία που δημιουργούνται από αυτή τη διαδικασία, απαιτούνται για την ανάπτυξη όγκων και μεταστάσεων. Αναστέλλοντας τη διαδικασία της αγγειογένεσης, το καρκινικό κύτταρο δεν αναπτύσσεται και οι αντικαρκινικοί παράγοντες μπορούν να αντιμετωπίσουν τα καρκινικά κύτταρα πιο αποτελεσματικά (Mackey et al, 2012).
- Χρήση ογκολυτικών αδενοϊών για τη θεραπεία του καρκίνου: Τεχνικές καινοτομίες έχουν οδηγήσει στη δημιουργία ασφαλέστερων ογκολυτικών ιών. Ο ιός μπορεί να ενισχυθεί με ειδικά μόρια έτσι ώστε να καταστεί πιο ισχυρός. Παρόλα αυτά, επί του παρόντος, φαίνεται ότι η ογκόλυση από μόνη της δεν είναι σε θέση να θεραπεύσει τον καρκίνο λόγω της μεγάλης πολυπλοκότητας του μηχανισμού λειτουργίας του (Pesonen et al, 2011).
- Χρήση εξειδικευμένων αναστολέων: Στις περισσότερες περιπτώσεις εμφάνισης καρκίνου, παρατηρείται απορρύθμιση συγκεκριμένων σηματοδοτικών μονοπατιών, με αποτέλεσμα είτε την υπερέκφραση συγκεκριμένων πρωτεϊνών, είτε την σύνθεση τροποποιημένων πρωτεϊνών.

Το μονοπάτι ALK (Anaplastic lymphoma kinase) και ROS1 (c-ros oncogene 1) αποτελεί παράδειγμα σηματοδοτικού μονοπατιού, όπου η απορρύθμιση του οδηγεί στη παραγωγή τροποποιημένων πρωτεϊνών. Οι ALK και ROS1 είναι υποδοχείς κινασών τυροσίνης. Σε πολλές περιπτώσεις έχει παρατηρηθεί σύμπτυξη των υποδοχέων, απορυθμίζοντας τον φυσιολογικό μηχανισμό λειτουργίας τους με αποτέλεσμα την παραγωγή χημائيικών πρωτεϊνών (Charest et al, 2003, Takeuchi et al, 2009). Γνωρίζοντας πλέον το μηχανισμό δράσης του υποδοχέα, οι επιστήμονες ανέπτυξαν τον αναστολέα PF-06463922. Ο αναστολέας PF-06463922 έχει την ικανότητα να συνδέεται και να αναστέλλει τις 2 κινάσες ALK και ROS, μειώνοντας το ρυθμό αύξησης του όγκου (Zou et al, 2015).

Το μονοπάτι PI3K/Akt εμπλέκεται σε πολλές λειτουργίες όπως η διαφοροποίηση, ο πολλαπλασιασμός και η απόπτωση. Στον καρκίνο, απορρύθμιση αυτού του μονοπατιού, οδηγεί σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων, αυξημένη έκφραση συγκεκριμένων πρωτεϊνών, μειωμένη διαφοροποίηση και μείωση του ρυθμού απόπτωσης των κυττάρων. Για την

αναστολή της λειτουργίας του έχει παραχθεί μία πληθώρα αναστολέων, κάποιοι εκ των οποίων έχουν την δυνατότητα να συνδέονται ταυτόχρονα σε δύο μόρια του σηματοδοτικού μονοπατιού (dual inhibitors) (Feldman et al, 2009).

## **Δ.2. Καρκίνος του θυρεοειδούς – Αναστολείς κινάσης τυροσίνης**

Ο καρκίνος του θυρεοειδούς είναι η πιο κοινή ενδοκρινική κακοήθεια. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η πλειονότητα των περιπτώσεων του καρκίνου του θυρεοειδούς θεραπεύεται με χειρουργική επέμβαση και ακολουθεί θεραπεία με ραδιενεργό ιώδιο, όταν αυτή ενδείκνυται. Οι περισσότεροι ασθενείς με θηλώδες ή θυλακιώδες καρκίνωμα μπορούν να θεραπευτούν επιτυχώς, ενώ άλλοι μπορούν να επιβιώσουν για δεκαετίες παρά την επιμονή της ασθένειας. Ωστόσο, σε περίπου 10% των περιπτώσεων η νόσος δεν είναι ιάσιμη με τις συμβατικές θεραπείες. Οι περισσότεροι θάνατοι, από καρκίνο του θυρεοειδούς, προέρχονται είτε από πτωχώς διαφοροποιημένα καρκινώματα (PDTC), είτε από αναπλαστικά καρκινώματα (ATC). Το μεγαλύτερο ποσοστό των μεταλλάξεων στα σηματοδοτικά μονοπάτια (για παράδειγμα στο PI3K-Akt-mTOR) οδηγούν στη δημιουργία αυτών των θανατηφόρων καρκινωμάτων (PDTC και ATC) (Liu et al, 2008). Μέχρι πρόσφατα, δεν υπήρχε καμία αποτελεσματική θεραπεία για αυτές τις περιπτώσεις. Οι εξελίξεις στον τομέα της μοριακής βιολογίας και η ανακάλυψη ογκογονιδίων, σχετιζόμενα με τον καρκίνο του θυρεοειδούς, σε συνδυασμό με τα παραπάνω δεδομένα, οδήγησαν στην ανάπτυξη και τη δοκιμή μιας νέας οικογένειας υποσχόμενων φαρμάκων, τους αναστολείς κινάσης τυροσίνης (TKIs). Αυτά τα φάρμακα συνδέονται σε πολλαπλούς υποδοχείς κινάσης τυροσίνης στη μεμβράνη του κυττάρου και αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την εξέλιξη της νόσου. Παρά το γεγονός ότι μέχρι στιγμής δεν έχουν καθοριστεί τα οφέλη από την άποψη της παράτασης της συνολικής επιβίωσης, υπάρχουν ισχυρά στοιχεία για τη βελτίωση της επιβίωσης των ασθενών με καρκίνο του θυρεοειδούς (Viola and Elisei, 2015).

Οι πιο ενδιαφέροντες αναστολείς αυτή τη στιγμή είναι το vandetanib και cabozantinib για το μυελοειδή καρκίνο του θυρεοειδούς (MTC) και το sorafenib και lenvatinib για τον Θηλώδη/Θυλακιώδη καρκίνο του θυρεοειδούς (PTC / FTC). Τα παραπάνω φάρμακα αναστέλλουν πολλαπλούς υποδοχείς κινάσης τυροσίνης (με διαφορετική δραστικότητα το καθένα), ενώ έχουν ως κοινό στοιχείο την αναστολή

του υποδοχέα του αγγειακού ενδοθηλιακού παράγοντα ανάπτυξης (VEGFR). Ένα νέο φάρμακο που δρα με έναν εντελώς διαφορετικό μηχανισμό είναι selumetinib. Σε αντίθεση με τους άλλους αναστολείς κινάσης τυροσίνης (TKIs), το selumetinib δρα ως εκλεκτικός αναστολέας του MEK 1/2 (Viola and Elisei, 2015).

Όλοι οι αναστολείς κινάσης τυροσίνης που έχουν αναπτυχθεί μέχρι σήμερα είναι σε θέση να μπλοκάρουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την εξέλιξη της νόσου μέχρι τη στιγμή που τα καρκινικά κύτταρα θα αναπτύξουν έναν μηχανισμό «απόδρασης». Ο μηχανισμός απόδρασης θα οδηγήσει και πάλι τα καρκινικά κύτταρα σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό και τελικά στην επιδείνωση της νόσου. Μελλοντικές κλινικές μελέτες θα πρέπει να καθορίσουν τη σειρά ή το συνδυασμό χορήγησης των φαρμάκων με σκοπό την αποτελεσματικότερη δράση των αναστολέων (Viola and Elisei, 2015).

Πολυάριθμες παρενέργειες των αναστολέων κινάσης τυροσίνης έχουν αναφερθεί. Σε διάφορες μελέτες, έχει απαιτηθεί η μείωση της δόσης του αναστολέα για βελτίωση της ανεκτικότητας του. Οι πιο συχνές ανεπιθύμητες ενέργειες σχετίζονται με το καρδιαγγειακό σύστημα (Υπέρταση, μυοκαρδιοπάθεια, εγκεφαλικό επεισόδιο) και με το δέρμα (εξανθήματα, προβλήματα στα χέρια και στα πόδια). Επίσης σε μερικές περιπτώσεις, έχει παρατηρηθεί ανύψωση της θυρεοτροπίνης (TSH), ειδικά κατά τη διάρκεια της θεραπείας με motesanib (Antonelli et al, 2011).

### **Δ.3. Ραπαμυκίνη, ο πρώτος αναστολέας του μονοπατιού PI3K-Akt-mToR**

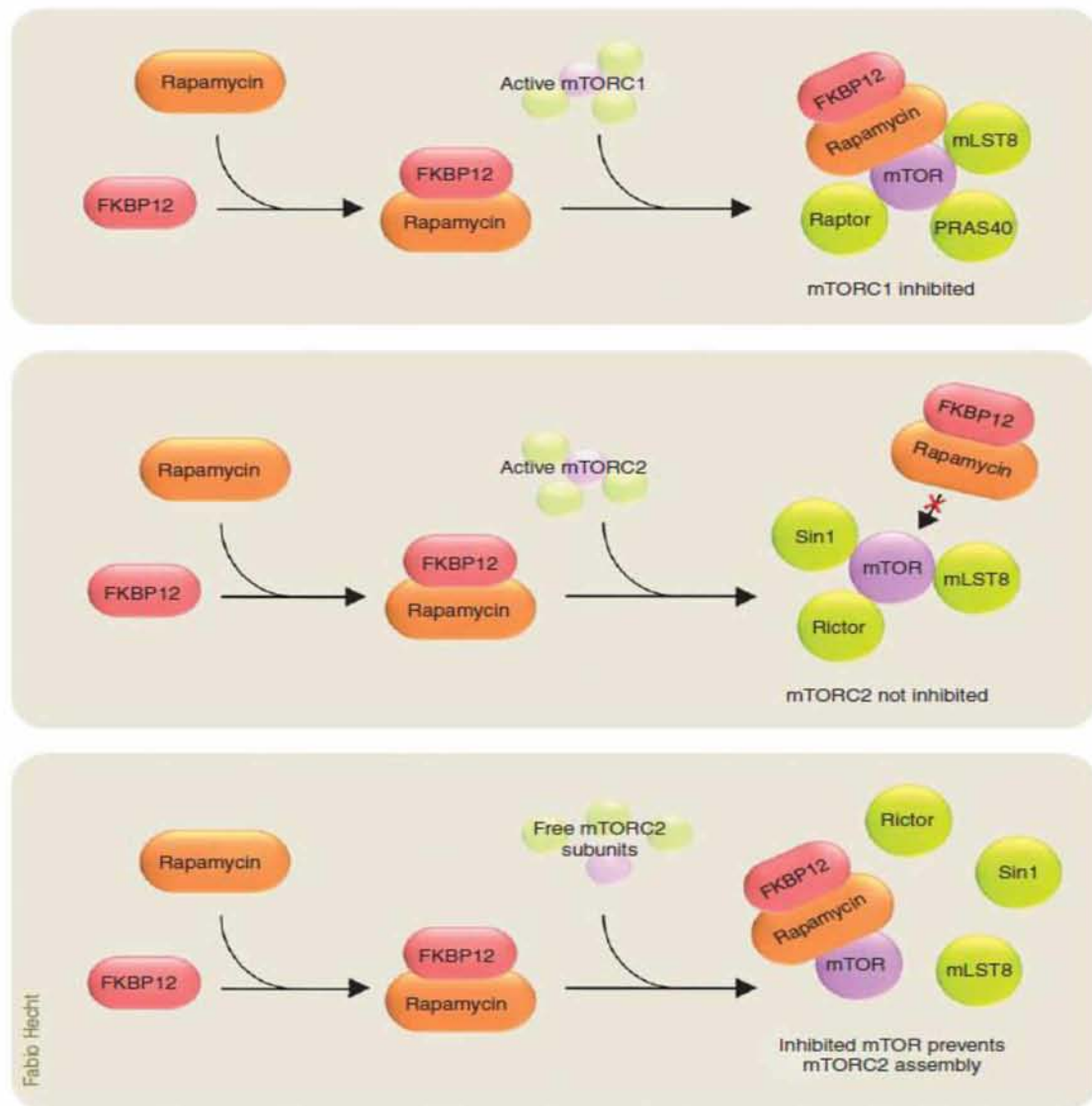
Η ραπαμυκίνη (rapamycin/sirolimus) ανακαλύφθηκε κατά τη διάρκεια ενός αντιβιοτικού ελέγχου στο νησί του Πάσχα και βρέθηκε ότι παράγεται από το βακτηριακό στέλεχος *Streptomyces hygroscopicus* (Mita et al, 2003). Αρχικά η ραπαμυκίνη εγκρίθηκε από τον FDA ως ανοσοκατασταλτικό φάρμακο και χρησιμοποιούνταν για την μεταμόσχευση οργάνων, για την πρόληψη μετα-αγγειακών επαναστενώσεων και ως χημειοθεραπευτικό σε σαρκώματα μαλακών ιστών και οστεοσαρκωμάτων (Yang and Guan, 2007).

Η πρωτεΐνη mToR (mammalian target of rapamycin) πήρε το όνομα της από την ικανότητα της ραπαμυκίνης να αναστέλλει τη δράση της. Έχοντας κατανοήσει τη σημαντικότητα του μορίου mToR, γίνεται πλέον αντιληπτή η σημαντικότητα της εύρεσης αναστολέων του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K-Akt-mToR. Ο πρώτος

αναστολέας που βρέθηκε για το mToR (και συγκεκριμένα για το mTORC1) είναι η ραπαμυκίνη. Η ικανότητα της ραπαμυκίνης να αναστέλλει τη λειτουργία του mToR εξαρτάται άμεσα από την ενδοκυτταρική πρωτεΐνη FKBP12 (FK506-binding protein) (Harris and Lawrence, 2003). Το mToR παρουσιάζει μειωμένη ικανότητα σύνδεσης με την ραπαμυκίνη και με τον FKBP12 όταν αυτά τα δύο είναι μη συνδεδεμένα μεταξύ τους. Όταν όμως πραγματοποιηθεί σύνδεση μεταξύ της ραπαμυκίνης και του FKBP12 τότε, το mToR συνδέεται με πολύ υψηλή συγγένεια με το σύμπλοκο με αποτέλεσμα να αναστέλλεται η δραστηριότητα κινάσης του mTORC1 συμπλόκου. Μεταλλάξεις στο υπεύθυνο γονίδιο για την σύνθεση του FKBP12 οδηγούν σε ολική απώλεια λειτουργικότητας της ραπαμυκίνης.

Όσον αφορά το mTORC2, δεν έχει παρατηρηθεί ικανότητα σύνδεσης του συμπλόκου ραπαμυκίνη - FKBP12 με το mTORC2 (Sarbassov et al, 2005). Ωστόσο, νέες έρευνες δείχνουν πως η ραπαμυκίνη μπορεί να αναστείλει την λειτουργικότητα του mTORC2 σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους (Sarbassov et al, 2006). Στην πραγματικότητα, το σύμπλοκο ραπαμυκίνη - FKBP12 δεν αναστέλλει τη λειτουργικότητα του mTORC2, αλλά εμποδίζει την σύνθεση του. Αρχικά το σύμπλοκο ραπαμυκίνη - FKBP12 συνδέεται στο mToR και εμποδίζει την σύνδεση των απαραίτητων πρωτεϊνών Rictor, Sin1 και mLST8 πάνω στο mToR. Έτσι το mTORC2 δεν μπορεί να κατασκευαστεί με τελικό αποτέλεσμα την υπολειτουργία του σηματοδοτικού μονοπατιού. Εάν βέβαια το σύμπλοκο mTORC2 έχει ήδη κατασκευαστεί, τότε το σύμπλοκο ραπαμυκίνη - FKBP12 δεν μπορεί να αναστείλει τη λειτουργία του, αν και νέες έρευνες δείχνουν πως παρατεταμένη χορήγηση της για μεγάλο χρονικό διάστημα μπορεί να οδηγήσει σε μερική καταστολή του συμπλόκου mTORC2 (Chiang and Abraham, 2007).

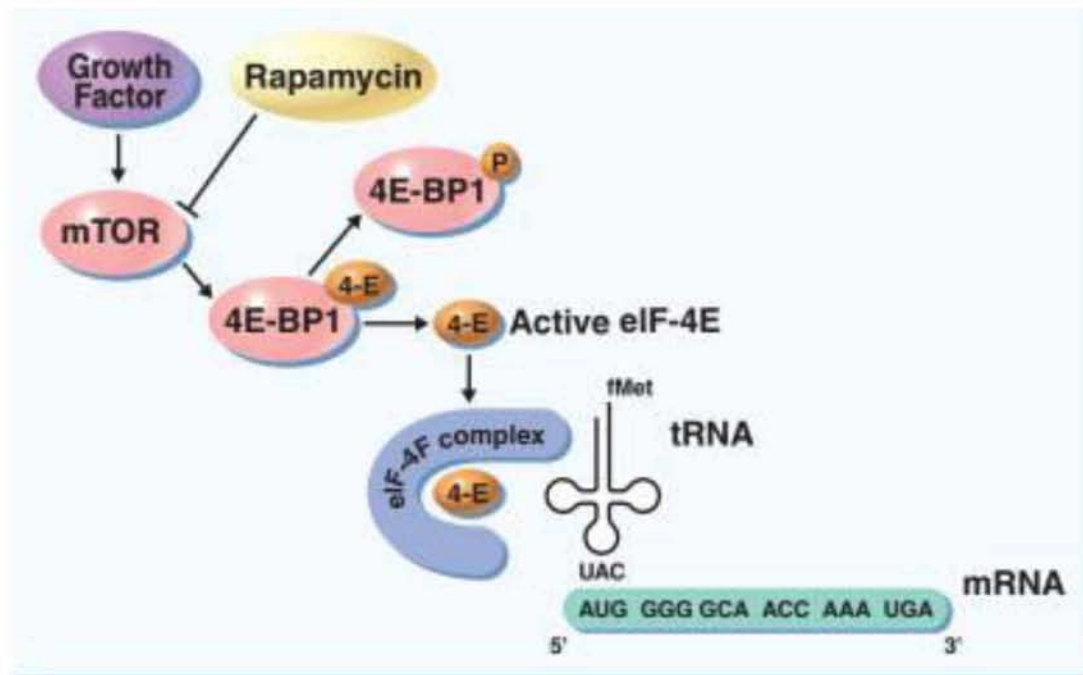
Η σύνδεση της ραπαμυκίνης στο mToR έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της δράσης του. Αυτό επιφέρει πολλές τροποποιήσεις μέσα στο κύτταρο. Όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως, το mToR είναι υπεύθυνο για την σύνθεση συγκεκριμένων πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι κυρίως υπεύθυνες για την μετάβαση του κυττάρου από τη φάση G1 στην S φάση. Η μετάβαση αυτή οδηγεί το κύτταρο στην έναρξη της αντιγραφής του. Όταν η ραπαμυκίνη αναστέλλει τη λειτουργία του mToR, οι πρωτεΐνες αυτές δεν παράγονται και έτσι ο κυτταρικός κύκλος διακόπτεται στην G1 φάση με αποτέλεσμα το κύτταρο να μην μπορεί να αντιγραφεί (Barbet et al, 1996).



Εικόνα 5: Μηχανισμός αναστολής των mTORC1 και mTORC2 από το σύμπλοκο Ραπαμυκίνη – FKBP12. (Souza et al, 2011)

Επιπλέον, η αναστολή της φωσφορυλίωσης του mTOR έχει ως αποτέλεσμα την διατήρηση της S6K1 στην ανενεργή μορφή της. Η S6K1, στην ενεργή μορφή της, είναι υπεύθυνη για την παραγωγή μίας ουσιώδους σημασίας κατηγορίας mRNA, υπεύθυνη για την κατασκευή του μεταφραστικού συμπλόκου. Έτσι η αναστολή της ενεργοποίησης της, μειώνει το ρυθμό σύνθεσης νέων πρωτεϊνών (Jefferies et al, 1997). Τέλος, η αναστολή του mTOR διατηρεί τον 4EBP1 στην αποφωσφορυλιωμένη της μορφή. Η αποφωσφορυλιωμένη μορφή του 4EBP1 συνδέεται σταθερά στον eIF4E και εμποδίζει την σύνδεση των mRNAs στο μεταφραστικό σύμπλοκο (Gingras et al, 1999).





Εικόνα 6: Τρόπος δράσης και λειτουργίας του συμπλόκου 4EBP1- eIF4E (Mita et al, 2003)

#### Δ.4. Αναστολείς mToR πρώτης γενιάς

Ακόμα κι αν τα προκλινικά δεδομένα υποδηλώνουν ότι η ραπαμυκίνη μπορεί να είναι αποτελεσματική ως αντικαρκινικό φάρμακο, στη πραγματικότητα η χορήγηση της αντενδείκνυται καθώς είναι ελάχιστα διαλυτή στο νερό και η χημική της σταθερότητα είναι περιορισμένη. Για αυτό το λόγο κρίθηκε σκόπιμο η εύρεση νέων αντικαρκινικών φαρμάκων, τα οποία θα έχουν παρόμοια λειτουργία με την ραπαμυκίνη, αλλά δεν θα φέρουν τα μειονεκτήματα της όπως η χαμηλή διαλυτότητα στο νερό. Τα φάρμακα αυτά ονομάζονται ανάλογα της ραπαμυκίνης (rapamycin analogs - rapalogs). Μέχρι στιγμής, έχουν παραχθεί τρία αποτελεσματικά ανάλογα της ραπαμυκίνης: το Temsirolimus (CCI-779), το Everolimus (RAD001) και το Deforolimus (Ridaforolimus/AP23573). Το Temsirolimus και Everolimus έχουν περάσει τις κλινικές δοκιμές και εγκρίθει από την Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration – FDA).

##### Temsirolimus (CCI-779):

Το Temsirolimus επελέγη από ερευνητές του “Wyeth-Ayerst Laboratories” και του Εθνικού Ινστιτούτου Καρκίνου (National Cancer Institute - NCI) με σκοπό την κλινική παραγωγή του ως αντικαρκινικό παράγοντα το 1999 (Mita et al, 2003).

Βασικό του πλεονέκτημα έναντι της ραπαμυκίνης είναι πως, αν και δυσδιάλυτο στο νερό, μπορεί να διαλυθεί εύκολα σε αιθανόλη (Strimpakos et al, 2009). Οι Mita et al. (2003) σύγκριναν την αποτελεσματικότητα του Temsirolimus με τη ραπαμυκίνη χρησιμοποιώντας ως διαγνωστικό εργαλείο το “60 tumor type-specific cell line screening panel”. Τα αποτελέσματα έδειξαν ένα παρόμοιο προφίλ αναστολής της ανάπτυξης των όγκων μεταξύ των δύο παραγόντων στο μεγαλύτερο ποσοστό των κυτταρικών σειρών.

Στις 30 Μαΐου 2007, η Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων χορήγησε την έγκριση για την εμπορική παραγωγή του Temsirolimus (Torisel <sup>TM</sup>, από Wyeth, Inc.) για τη θεραπεία του προχωρημένου καρκινώματος των νεφρών (RCC). (<http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/fda-temsirolimus>).

#### Everolimus (RAD001):

Το Everolimus ανήκει στη κατηγορία των ανάλογων της ραπαμυκίνης (rapalogs). Χαρακτηριστικό του πλεονέκτημα έναντι της ραπαμυκίνης είναι η ικανότητα του να διαλύεται εύκολα στο νερό όπως επίσης και η δυνατότητα να χορηγείται μέσω της πεπτικής οδού. Χορήγηση του σε γενετικά τροποποιημένα ποντίκια (nude mice), που τους είχαν εμφυτευτεί ξενομοσχεύματα όγκων από ανθρώπους, έδειξε πως μία και μόνο δόση των 0.5-5.0 kg/ημέρα μπορούσε να οδηγήσει σε υψηλή αναστολή της ανάπτυξης του όγκου. Επιπλέον, η γαστρεντερική απορρόφηση του ήταν ταχεία ενώ ο χρόνος κατακράτησης του φαρμάκου ήταν πολύ μεγαλύτερος στη περιοχή του όγκου από ότι στο πλάσμα. Τέλος, βρέθηκε πως η αντικαρκινική δραστηριότητα του Everolimus in vivo είναι πολύ υψηλότερη από αυτή που επέδειξε στα πειράματα in vitro. Οι ερευνητές θεωρούν πως το Everolimus μπορεί ταυτόχρονα να σχετίζεται με αναστολή της αγγειογένεσης στη περιοχή του όγκου (Mita et al, 2003).

Στις 29 Οκτώβρη 2010, η Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) έδωσε την έγκριση για την παρασκευή δισκίων Everolimus (Afinitor®), για τη θεραπεία ασθενών με οζώδης σκλήρυνση (TSC) που απαιτεί θεραπευτική παρέμβαση, αλλά δεν μπορεί να αφαιρεθεί χειρουργικά (<http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/fda-everolimus>).

## Δ.5. Αναστολείς mToR δεύτερης γενιάς

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, οι αναστολείς mToR πρώτης γενιάς φάνηκαν αποτελεσματικοί σε μία σειρά προκλινικών και κλινικών δοκιμών. Παρόλα αυτά, η δραστηριότητα τους σε μία σειρά συμπαγών όγκων φαίνεται να είναι χαμηλή (τουλάχιστον για το Everolimus και το Temsirolimus) (Zhang et al, 2011). Ένα από τα σημαντικά μειονεκτήματα των ραπαλόγων (rapalogs) είναι η ικανότητα τους να συνδέονται και να αναστέλλουν μόνο τη λειτουργία του mTORC1 και όχι του mTORC2 (εκτός από ελάχιστες περιπτώσεις). Μία δεύτερη αδυναμία των ραπαλόγων σχετίζεται με τον μηχανισμό ανάδρασης μεταξύ του mTORC1 και του Akt.

Ερευνες έδειξαν πως, έπειτα από την αναστολή του mTORC1, παρατηρείται αύξηση της δραστηριότητας του Akt μέσω ενός μηχανισμού αρνητικής ανάδρασης (Wan et al, 2007). Αυτό σημαίνει πως, έπειτα από την αναστολή της ενεργοποίησης του mTORC1, το Akt ενεργοποιείται από το κύτταρο με σκοπό την αντιστάθμιση της δράση του ραπαλόγου. Αυτές οι παρατηρήσεις οδήγησαν τους ερευνητές στην αναζήτηση αναστολέων οι οποίοι θα εμποδίζουν την ενεργοποίηση του Akt. Οι αναστολείς αυτοί στοχεύουν ταυτόχρονα το mTORC1 και το mTORC2 σύμπλοκο ή ακόμα και το Akt (διπλοί αναστολείς). Οι διπλοί αναστολείς μπορούν να μειώσουν δραματικά την αυξημένη δραστηριότητα του Akt από το μηχανισμό ανάδρασης του κυττάρου (Feldman et al, 2009).

### ATP-ανταγωνιστικοί αναστολείς κινάσης mTOR (ATP-competitive mTOR kinase inhibitors):

Τα τελευταία χρόνια έχει εμφανιστεί ένα έντονο ενδιαφέρον για τους ATP-ανταγωνιστικούς διπλούς αναστολείς. Σύμφωνα με τους Zhang et al (2011), η λογική πίσω από αυτό το ενδιαφέρον κρύβεται σε τρία βασικά στοιχεία:

- i) Η υπέρμετρη ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K-Akt-mToR είναι ένα βασικό χαρακτηριστικό ενός ευρέος φάσματος ανθρώπινων καρκίνων
- ii) Τα ραπάλογα προκαλούν ενεργοποίηση του Akt μέσω ενός αρνητικού βρόγχου
- iii) Το mTORC2 εμπλέκεται στην ανάπτυξη και επιβίωση των καρκινικών κυττάρων και δεν αναστέλλεται από τα ραπάλογα

Έπειτα από πολλαπλές προσπάθειες από τον ακαδημαϊκό και βιομηχανικό χώρο, εντοπίστηκαν και αναπτύχθηκαν οι ATP-ανταγωνιστικοί αναστολείς κινάσης mTOR. Καθώς οι περιοχές με δραστικότητα κινάσης τόσο του mTOR όσο και του PI3K παρουσιάζουν μεγάλες ομοιότητες, πολλές φορές παρατηρείται ένας αναστολέας να συνδέεται και να μπλοκάρει ταυτόχρονα και τα δύο μόρια (Zhang et al, 2011). Οι αναστολείς mTOR δεύτερης γενιάς έχουν την ικανότητα να συνδέονται στην θέση σύνδεσης του ATP (ATP-binding site) στην περιοχή με δραστικότητα κινάσης του mTOR (mTOR kinase domain). Αποτέλεσμα αυτής της σύνδεσης είναι η μείωση της ενεργότητας και των δύο συμπλόκων mTOR (mTORC1 και mTORC2). Καθώς το mTORC2 και το PI3K επηρεάζουν άμεσα την φωσφορυλίωση του Akt, γίνεται κατανοητό πως οι νέοι αναστολείς αποτρέπουν την ενεργοποίηση του αρνητικού μηχανισμού ανάδρασης mTORC1 – Akt εξαλείφοντας το βασικό μειονέκτημα των αναστολέων πρώτης γενιάς.

#### Διπλοί αναστολείς mTOR/PI3K (mTOR/PI3K dual inhibitors - TPdIs):

Ένας μεγάλος αριθμός διπλών αναστολέων PI3K-mTOR έχει αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια. Ο PI103 είναι ένας από τους πρώτους διπλούς αναστολείς που αναπτύχθηκαν (Raynaud et al, 2009). Αν και η αντικαρκινική του δράση έχει χαρακτηριστεί ως αρκετά αποτελεσματική, η in vivo φαρμακοκινητική του θεωρείται αρκετά πτωχή. Παρόλα αυτά, ο PI103 χρησιμοποιείται για την διερεύνηση του μονοπατιού PI3K-Akt όπως επίσης και για την κατασκευή νέων διπλών αναστολέων PI3K-mTOR. Αρκετοί ATP – ανταγωνιστικοί αναστολείς συμπεριλαμβανομένων των PI540, PI620, WYE354, WAY600, WYE687 και Ku0063794 κατασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας ως βασικό στοιχείο το PI103 (Workman et al, 2010).

#### Διπλοί αναστολείς mTORC1/mTORC2 (mTORC1/mTORC2 dual inhibitors-TORCdIs):

Τα τελευταία χρόνια έχει αναπτυχθεί μία πλειάδα διπλών αναστολέων οι οποίοι στοχεύουν τα 2 σύμπλοκα mTORC1 και mTORC2. Μέσα σε αυτούς συμπεριλαμβάνονται οι INK128, XL388, OSI027, AZD2014 και AZD8055 μερικοί από τους οποίους έχουν ήδη περάσει τις κλινικές δοκιμές (García-Echeverría, 2010).



## **E. Υλικά και Μέθοδοι**

### **E.1. Κυτταρικές σειρές**

Οι κυτταρικές σειρές που καλλιεργήθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα είναι οι 8505C και PTC. Και οι δύο κυτταρικές σειρές είναι καρκινικές κυτταρικές σειρές του θυρεοειδούς. Τα PTC (Papillary Thyroid Cancer) έχουν απομονωθεί από πρωτογενή όγκο του θυρεοειδούς προερχόμενο από θυλακιώδη κύτταρα και καλλιεργηθεί ώστε να αναπτυχθεί η κυτταρική σειρά. Τα κύτταρα που απομονώθηκαν για την ανάπτυξη της κυτταρικής σειράς συγκεκριμένα προέρχονται από επιθετική μορφή θηλώδους καρκίνου (aPTC). Η λήψη των κυττάρων εγκρίθηκε από τη Θεσμική Επιτροπή Έρευνας στο Πανεπιστήμιο του Γενικού Λαϊκού Νοσοκομείου στην Αθήνα (Kouvaraki et al, 2011, Moraitis et al, 2014). Τα 8505C είναι κύτταρα τα οποία προέρχονται από αδιαφοροποίητο καρκίνωμα του θυρεοειδούς (ATC) και καλλιεργήθηκαν με σκοπό την ανάπτυξη της κυτταρικής σειράς. Η κυτταρική σειρά είναι μία δωρεά της Milica Pesic από το τμήμα Νευροβιολογίας του πανεπιστημίου Βελιγραδίου στη Σερβία.

### **E.2. Πρωτόκολλο καλλιέργειας κυττάρων**

Η ανάπτυξη των κυτταρικών σειρών πραγματοποιείται σε επωαστικό κλίβανο με σταθερή θερμοκρασία (37° C), σταθερές συνθήκες CO<sub>2</sub> (5% CO<sub>2</sub>) και κατάλληλες συνθήκες υγρασίας. Ο χειρισμός των κυττάρων πραγματοποιείται υπό ασηπτικές συνθήκες σε εστία νηματικής ροής (hood). Και οι δύο κυτταρικές σειρές αναπτύσσονται προσκολλημένες στην επιφάνεια σχηματίζοντας μία μονή στοιβάδα (Attached Monolayer Cell Culture).

Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε φλάσκες της Corning® (75cm<sup>2</sup> U-Shaped/Product 431464U). Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη των κυττάρων είναι το RPMI 1640 medium της Gibco®. Σε αυτό προστίθεται επιπλέον:

- 5% ορός εμβρύου βοοειδούς (Fetal Bovine Serum/FBS 1001G/500) της Biosera
- 1% Αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη της Biochrom
- 1% L-Γλουταμίνη G7513 της Sigma-Aldrich

Όταν το ποσοστό των κυττάρων που καλύπτουν την επιφάνεια της φλάσκας φτάσει το 80%, πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια των κυττάρων (subculturing/passaging).

Με την ανακαλλιέργεια απομακρύνονται οι τοξικές ουσίες που παράγουν τα κύτταρα, ανανεώνεται το θρεπτικό υλικό και διατηρούνται τα κύτταρα στο απαραίτητο ποσοστό για την ομαλή ανάπτυξή τους.

Αρχικά απομακρύνεται όλο το θρεπτικό υλικό με μία αποστειρωμένη πιπέτα. Ακολουθεί ξέπλυμα της φλάσκας με ισοτονικό διάλυμα PBS 1x. Έπειτα, αφού αφαιρεθεί το PBS, προστίθεται επαρκής ποσότητα τρυψίνης 1x (συνήθως 2ml). Η τρυψίνη που χρησιμοποιείται είναι η Trypsin 10x της Biosera με κωδικό XC – T1717 και αραιώνεται σε PBS 1x ώστε να παραχθεί η τρυψίνη 1x. Η φλάσκα τοποθετείται στον επωαστικό κλίβανο στους 37° C για 2 λεπτά. Στη συνέχεια, η φλάσκα δέχεται ελαφρά χτυπήματα ώστε να ξεκολλήσουν τα κύτταρα. Για να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα της τρυψίνης, η φλάσκα ελέγχεται σε ανάστροφο μικροσκόπιο. Εφόσον έχουν αποκολληθεί τα κύτταρα, προστίθεται στη φλάσκα θρεπτικό υλικό ώστε να απενεργοποιηθεί η τρυψίνη. Από το θρεπτικό υλικό που περιέχει τα κύτταρα, μόνο 5% θα επιστρέψει στην παλαιά φλάσκα (ή σε καινούργια φλάσκα). Στην συνέχεια, δεδομένου ότι στη φλάσκα διατηρήθηκε μόνο το 5% των κυττάρων, προστίθεται επιπλέον θρεπτικό υλικό. Έτσι δίνεται εκ νέου η δυνατότητα στα κύτταρα να αναπτυχθούν ταχέως. Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιείται 1 φορά την εβδομάδα.

Εάν τα κύτταρα δεν έχουν καλύψει επαρκώς την φλάσκα αλλά το θρεπτικό υλικό έχει μεταβολιστεί, τότε αντί για ανακαλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιείται ανανέωση του θρεπτικού υλικού απομακρύνοντας το παλιό μεταβολισμένο υλικό και προσθέτοντας νέο υλικό. Η ανανέωση του θρεπτικού υλικού γίνεται κάθε 2 μέρες.

### E.3. Κατάψυξη κυττάρων

Πολλές φορές είναι επιθυμητό να αποθηκεύονται τα κύτταρα για μελλοντική χρήση. Η αποθήκευση εξασφαλίζει τη διατήρηση των κυττάρων, την αποφυγή της κυτταρικής γήρανσης και μειώνει την πιθανότητα της γενετικής παρέκκλισης. Για την κατάψυξη των κυττάρων είναι απαραίτητη η χρήση ενός κρυο-προστατευτικού παράγοντα καθώς χωρίς αυτόν η ψύξη θα ήταν θανατηφόρα για τα κύτταρα. Ο κρυο-προστατευτικός παράγοντας είναι το DMSO (Dimethylsulfoxide 99.8%) της Acros Organics, το οποίο δημιουργεί ένα βραδύτερο ρυθμό ψύξης. Η σταδιακή ψύξη μειώνει την πιθανότητα δημιουργίας κρυστάλλων πάγου και καταστροφής των

κυττάρων. Το DMSO χορηγείται μαζί με FBS (90% FBS + 10% DMSO) κατασκευάζοντας το freezing medium.

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι παρόμοια με αυτή της ανακαλλιέργειας των κυττάρων. Αρχικά αφαιρείται το θρεπτικό υλικό από την φλάσκα και στη συνέχεια η φλάσκα ξεπλένεται με PBS 1x. Έπειτα αφαιρείται το PBS, και προστίθεται η τρυψίνη. Με την αποκόλληση των κυττάρων από την τρυψίνη, προστίθεται θρεπτικό υλικό για την απενεργοποίηση της. Στη συνέχεια, το υλικό μεταφέρεται σε έναν σωλήνα φυγοκέντρησης. Ακολουθεί φυγοκέντρηση του σωλήνα στις 1200 στροφές για πέντε λεπτά. Με την ολοκλήρωση της φυγοκέντρησης, τα κύτταρα έχουν προσκολληθεί ως ίζημα στο πάτο του σωλήνα (pellet) ενώ το θρεπτικό υλικό βρίσκεται στο πάνω τμήμα του σωλήνα ως υπερκείμενο (supernatant). Ακολουθεί απομάκρυνση του υπερκείμενου ενώ προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα freezing medium (1ml για κάθε  $4 \times 10^6$  cells). Μετά από καλή ανάδευση των κυττάρων στο freezing medium, τοποθετείται 1ml σε κάθε cryovial. Τα cryovials αποθηκεύονται σε καταψύκτη  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### E.4. Απόψυξη κυττάρων

Η απόψυξη των κυττάρων πρέπει να γίνει γρήγορα, ενώ το ποσοστό των κυττάρων που θα επιστρώσουν την φλάσκα πρέπει να είναι τέτοιο ώστε να καλύπτει το μεγαλύτερο τμήμα της επιφάνειας της. Έπειτα από την απομάκρυνση των cryovials από τον καταψύκτη, τοποθετούνται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας  $37^{\circ}\text{C}$ . Τα cryovials πρέπει να αναδεύονται συνεχόμενα μες στο υδατόλουτρο μέχρι να ξεπαγώσουν πλήρως. Στη συνέχεια το υλικό του cryovial τοποθετείται σε σωλήνα και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 900 στροφές για 10 λεπτά. Με την ολοκλήρωση της φυγοκέντρησης απομακρύνεται το υπερκείμενο (το οποίο περιέχει το DMSO που μπορεί να αποβεί τοξικό για τα κύτταρα). Τα κύτταρα επαναιωρούνται σε θρεπτικό υλικό και τοποθετούνται σε φλάσκα. Ύστερα από 24 ώρες, η φλάσκα ελέγχεται ώστε να επιβεβαιωθεί η προσκόλληση των κυττάρων.

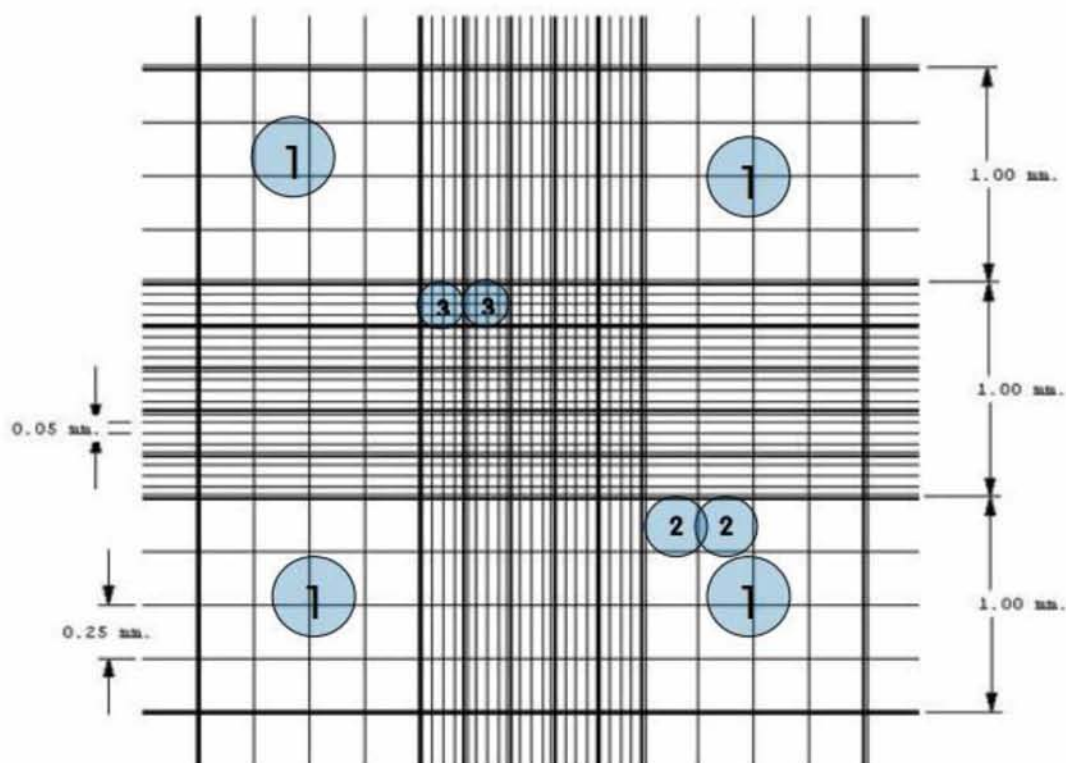
#### E.5. Καταμέτρηση των κυττάρων

Η καταμέτρηση των κυττάρων σε μία φλάσκα είναι πολλές φορές μια απαραίτητη διαδικασία για την περάτωση ενός πειράματος με ακρίβεια. Αναγκαίο εργαλείο για την καταμέτρηση των κυττάρων είναι το αιμοκυτταρόμετρο, μία παχιά



γυάλινη πλάκα με μία κεντρική και τέσσερις περιφερικές περιοχές σχεδιασμένες για την καταμέτρηση. Στη παρούσα διπλωματική εργασία για την καταμέτρηση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το αιμοκυτταρόμετρο 'Neubauer Improved'. Η διαδικασία που ακολουθείται για την καταμέτρηση είναι ίδια με την ανακαλλιέργεια των κυττάρων ως το στάδιο της απενεργοποίησης της τρυψίνης με θρεπτικό υλικό. Ύστερα από την απενεργοποίηση, 90 μl από υλικό μεταφέρονται σε ένα μικρό σωληνάκι erpendorf. Στο erpendorf προστίθενται 10μl χρωστικής Trypan Blue 0.4% (w/v). Πάνω στο αιμοκυτταρόμετρο τοποθετείται μία καλυπτρίδα. Έπειτα, με τη βοήθεια μίας πιπέτας, μετακινούνται τα 100 μl από το erpendorf στο αιμοκυτταρόμετρο εφαρμόζοντας την πιπέτα στην άκρη της καλυπτρίδας. Αφού τοποθετηθεί όλη η ποσότητα, αρχίζει η καταμέτρηση των κυττάρων. Η καταμέτρηση γίνεται σε μικροσκόπιο με μεγέθυνση 100x.

Η Neubauer improved περιέχει 2 πανομοιότυπα τμήματα στο άνω και στο κάτω τμήμα της. Το μέτρημα μπορεί να γίνει σε όποιο τμήμα επιθυμούμε. Το κάθε τμήμα αποτελείται από μικρότερες περιοχές. Υπάρχουν πολλές μέθοδοι για την καταμέτρηση των κυττάρων.



Εικόνα 8: Τμήματα της Neubauer improved

(<http://www.celeromics.com/en/resources/Technical%20Notes/cells-chamber-concentration.php>)

Αρχικά γίνεται καταμέτρηση των κυττάρων στις τέσσερις περιοχές με τον αριθμό 1. Έπειτα το αποτέλεσμα διαιρείται με το τέσσερα. Ο αριθμός αυτός πολλαπλασιάζεται με το 1000 ( $10^4$ ). Ο τελικός αριθμός αντικατοπτρίζει τον αριθμό των κυττάρων ανά 1ml. Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται για τις παραπάνω διαδικασίες (Ανακαλλιέργεια κυττάρων, Ανανέωση θρεπτικού υλικού, Κατάψυξη κυττάρων, Απόψυξη κυττάρων, Καταμέτρηση κυττάρων) είναι μία ελαφρώς τροποποιημένη μορφή του πρωτοκόλλου Basic Techniques for Mammalian Cell Tissue Culture (Phelan, 2007).

#### E.6. Παρασκευή Αναστολέων σε διαλυτή μορφή

Για την διεκπεραίωση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν έξι αναστολείς. Η αγορά των αναστολέων έγινε από την AdooQ® Bioscience. Οι αναστολείς που αγοράστηκαν είναι οι εξής:

- Everolimus (RAD001) 10mg με Catalog No. A10374 (MW: 958.2)
- Deforolimus (Ridaforolimus) 10mg με Catalog No. A10295 (MW: 990.2)
- XL388 5mg με Catalog No. A12395 (MW: 455.5)
- AZD2014 5mg με Catalog No. A11303 (MW: 462.5)
- AZD8055 10mg με Catalog No. A10114 (MW: 465.5)

Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε ο αναστολέας Temsirolimus (με MW:1030.28), ο οποίος κατασκευάζεται από την Wyeth Pharmaceuticals. Οι αναστολείς που αγοράστηκαν ήταν σε μορφή σκόνης οπότε έπρεπε να διαλυθούν. Η διάλυση των αναστολέων έγινε σε DMSO (Dimethylsulfoxide 99.8%) με σκοπό τη παρασκευή αναστολέων συγκέντρωσης 20mM.

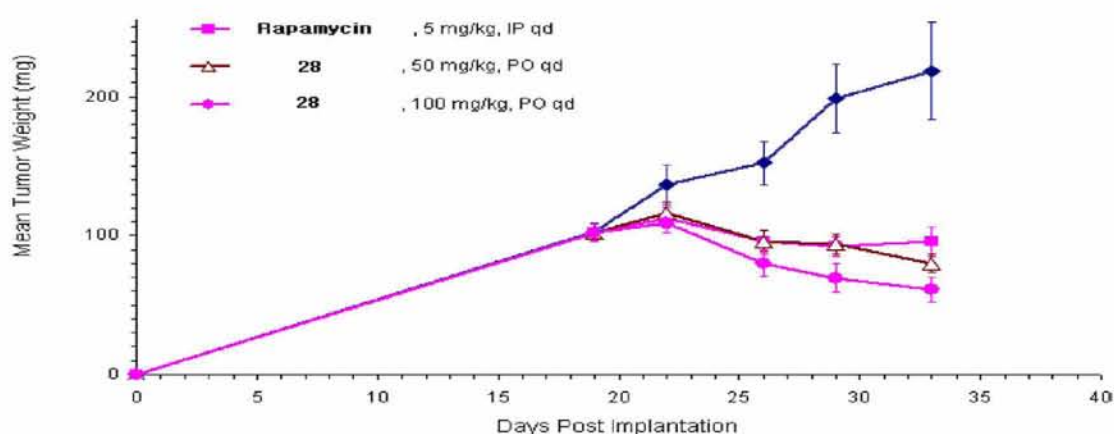
Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, το Everolimus και Temsirolimus είναι δύο αναστολείς οι οποίοι έχουν περάσει τις κλινικές δοκιμές και έχουν εγκριθεί από τον φορέα FDA (Food and Drug Administration) για χρήση σε ασθενείς. Οι υπόλοιποι αναστολείς βρίσκονται σε στάδια κλινικών δοκιμών.

#### Deforolimus (Ridaforolimus/AP23573):

Το Deforolimus είναι το πιο πρόσφατο ανάλογο της ραπαμυκίνης. Οι κλινικές δοκιμές σε ασθενείς με συμπαγείς όγκους έδειξαν μία πολλά υποσχόμενη αντικαρκινική δραστηριότητα ταυτόχρονα με τον χαμηλό βαθμό τοξικότητας του φαρμάκου (Strimpakos et al, 2009).

### Χημική Ένωση 28 (XL388):

Το XL388 ανήκει στην κατηγορία των διπλών αναστολέων mTORC1/mTORC2. Έπειτα από μελέτες, αποδείχθηκε η αντικαρκινική του δράση *in vitro* όπως επίσης και η υψηλή φαρμακοδυναμική του απόδοση. Τα στοιχεία αυτά οδήγησαν στη συγκρότηση πειραμάτων *in vivo* κατά τα οποία συγκρίθηκε η αποτελεσματικότητα του XL388 σε σχέση με την ραπαμυκίνη (Takeuchi et al, 2013). Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε θηλυκά αθυμικά ποντίκια στα οποία εμφυτεύτηκαν ξενομοσχεύματα όγκων MCF-7. Το XL388 χορηγούνταν μέσω της πεπτικής οδού διαλυμένο σε νερό καθημερινά μία φορά την ημέρα σε δόσεις των 50 mg/kg και 100 mg/kg για 14 ημέρες. Η ραπαμυκίνη χορηγούνταν ενδοπεριτοναϊκά (ip) σε συγκέντρωση 5 mg/kg διαλυμένη σε 12.5% αιθανόλη, 12.5% cremophor, και 75% HBSS (Hank's balanced salt solution) καθημερινά μία φορά την ημέρα για 14 ημέρες. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως το XL388 οδήγησε σε ολική αναστολή της ανάπτυξης των όγκων και στις δύο δόσεις (50 mg/kg και 100 mg/kg) με μείωση του όγκου 22% και 40% αντίστοιχα. Επιπλέον τα ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε η δόση 50 mg/kg απέκτησαν κατά μέσο όρο 2,2% επιπρόσθετη μάζα ενώ σε αυτά που χορηγήθηκε η δόση 100 mg/kg εμφάνισαν απώλεια μάζας κατά μέσο όρο 2,8%. Είναι σημαντικό επίσης να σημειωθεί πως δεν παρατηρήθηκαν σημαντικά ζητήματα τοξικότητας στα ποντίκια. Τέλος, η ραπαμυκίνη οδήγησε σε μείωση του ρυθμού ανάπτυξης των όγκων χωρίς όμως να παρατηρηθεί μείωση του μεγέθους των όγκων.



Γράφημα 1: *In vivo* αποτελεσματικότητα του XL388 (Takeuchi et al, 2013)

#### AZD2014:

Το AZD2014 ανήκει στην κατηγορία των διπλών αναστολέων mTORC1/mTORC2. Οι *Guichard et al.* (2015) πραγματοποίησαν σύγκριση in vitro του AZD2014 και του Everolimus σε διάφορες κυτταρικές σειρές. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως, το AZD2014 οδηγούσε σε πληρέστερη αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης συγκρινόμενο με το Everolimus. Ακολούθησαν προκλινικές δοκιμές σε ποντίκια στα οποία είχαν εμφυτευτεί μια πληθώρα ξενομοσχευμάτων. Εκεί φάνηκε ότι, το AZD2014 προκαλεί σημαντική αναστολή της ανάπτυξης των όγκων στο μεγαλύτερο ποσοστό των ξενομοσχευμάτων. Το 2015 πραγματοποιήθηκαν οι πρώτες κλινικές δοκιμές του AZD2014 για τον έλεγχο των φαρμακοδυναμικών και φαρμακοκινητικών δυνατοτήτων του. Αρχικά ελέγχθηκε η Μέγιστη Ανεκτή Δόση (Maximum Tolerated Dose - MTD). Στους ασθενείς χορηγήθηκαν δόσεις των 25mg έως 100mg. Βρέθηκε πως η MTD είναι τα 50mg. Από την βιοψία των δειγμάτων έπειτα από την χορήγηση του AZD2014 παρατηρήθηκε ότι, τα επίπεδα έκφρασης των p-S6 και Ki67 ήταν μειωμένα (Scholzen and Gerdes, 2000). Είναι πάντως σημαντικό να σημειωθεί πως οι ασθενείς εμφάνισαν αρκετές παρενέργειες με πιο σημαντικές την ναυτία και κόπωση (Basu et al, 2015).

#### AZD8055:

Το AZD8055 ανήκει στην κατηγορία των διπλών αναστολέων mTORC1/mTORC2. Οι *Zhao et al.* (2014) θέλησαν να ελέγξουν την επίδραση του AZD8055 στο σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K-Akt-mToR. Για την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου ελέγχθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των EIF4E και p-4EBP1 μέσω της τεχνικής ανάλυσης Western Blotting. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως οι δύο πρωτεΐνες που μελετήθηκαν, παρουσίασαν σημαντική μείωση στα επίπεδα έκφρασης τους με έναν δοσοεξαρτώμενο συσχετισμό. Σε μία προγενέστερη έρευνα οι *Chrestal et al* (2010) θέλησαν να ελέγξουν και να συγκρίνουν την ενεργότητα του Akt έπειτα από την αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων με AZD8055 και ραπαμυκίνη. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η ταυτόχρονη αναστολή των mTORC1 και mTORC2 από το AZD8055 εμποδίζουν την φωσφορυλίωση του Akt στη σερίνη 473, καθιστώντας ανίκανη την ενεργοποίησή του. Αντίθετα η ραπαμυκίνη όχι μόνο δεν ανέστειλε την ενεργοποίηση του Akt, αλλά οδήγησε και σε σημαντική αύξηση της φωσφορυλίωσης της στη σερίνη 473.

### E.7. Έλεγχος κυτταροτοξικότητας (SRB Assay)

Ο έλεγχος της κυτταροτοξικότητας έχει ως σκοπό την μέτρηση της αποτελεσματικότητας συγκεκριμένων φαρμάκων – αναστολέων διαφορετικών συγκεντρώσεων σε συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές. Η αρχή του SRB Assay βασίζεται στην ικανότητα της χρωστικής sulforhodamine B (SRB) να συνδέεται ηλεκτροστατικά και pH-εξαρτώμενα σε βασικά αμινοξικά κατάλοιπα. Κάτω από ελαφρά όξινες συνθήκες, η χρωστική συνδέεται στις πρωτεΐνες των κυττάρων ενώ κάτω από ελαφρά βασικές συνθήκες, η χρωστική αυτή μπορεί να εξαχθεί από τα κύτταρα. Η μέτρηση της αποτελεσματικότητας γίνεται με την μέτρηση της οπτικής πυκνότητας της χρωστικής. Ολόκληρος ο έλεγχος της κυτταροτοξικότητας πραγματοποιείται σε ειδικά κατασκευασμένες πλάκες με πηγαδάκια, τα επονομαζόμενα 96 well plates (Corning® Costar® cell culture 96 well plate) και διαρκεί πέντε ημέρες.

Σε ένα 96 well plate (1<sup>ο</sup> 96 well plate) επιστρώνονται κύτταρα για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας των αναστολέων. Επίσης, σε κάποια από αυτά τα wells δεν επιστρώνονται αναστολείς. Τα wells αυτά θα ελεγχθούν στο τέλος για την ανάπτυξη των κυττάρων απουσία αναστολέων (control wells). Η ανάπτυξη των κυττάρων αυτών διακόπτεται την πέμπτη και τελευταία μέρα.

Σε ένα νέο 96 well plate (2<sup>ο</sup> 96 well plate) επιστρώνεται επίσης ίδια ποσότητα κυττάρων. Η ανάπτυξη των κυττάρων αυτών θα σταματήσει την τρίτη ημέρα, ώστε να είναι γνωστό το αρχικό ποσό των κυττάρων πριν τη χορήγηση των αναστολέων (Tz κύτταρα). Έτσι, με την ολοκλήρωση του πειράματος, θα είναι γνωστή η συγκέντρωση των κυττάρων πριν τη χορήγηση των αναστολέων, η συγκέντρωση των κυττάρων χωρίς τη χορήγηση των αναστολέων και η συγκέντρωση των κυττάρων με τη χορήγηση των αναστολέων.

#### *1<sup>η</sup> Ημέρα:*

Για την έναρξη του ελέγχου κυτταροτοξικότητας είναι απαραίτητο η φλάσκα που θα χρησιμοποιηθεί να είναι πλήρης σε ποσοστό από 70 έως 80%. Όταν η φλάσκα είναι πλήρης στο απαραίτητο ποσοστό, πραγματοποιείται ανανέωση του θρεπτικού υλικού.

## *2<sup>η</sup> Ημέρα:*

Η επόμενη μέρα αρχίζει με την αποκόλληση των κυττάρων από την φλάσκα με τη βοήθεια της τρυψίνης. Τα πρώτα στάδια είναι ίδια με την μέθοδο της ανακαλλιέργειας των κυττάρων. Με την αποκόλληση των κυττάρων ακολουθεί η απενεργοποίηση της τρυψίνης με την προσθήκη θρεπτικού υλικού. Ακολουθεί μέτρηση των κυττάρων με την βοήθεια του αιμοκυτταρόμετρου. Σκοπός είναι η μεταφορά 5000 κυττάρων σε όγκο 100μl σε κάθε well του 96 well-plate. Ανάλογα με το πόσα wells πρέπει να γεμίσουν, γίνεται υπολογισμός του απαραίτητου αριθμού των κυττάρων. Στη συνέχεια μεταφέρεται η κατάλληλη ποσότητα ml (που περιέχει τη σωστή ποσότητα κυττάρων) σε σωλήνα φυγοκέντρησης. Με την ολοκλήρωση της φυγοκέντρησης απομακρύνεται το υπερκείμενο. Ακολουθεί προσθήκη θρεπτικού υλικού ανάλογα με τα wells που θα επιστρωθούν με κύτταρα. Δηλαδή προστίθεται θρεπτικό υλικό 100 μl x τον αριθμό των wells που θα επιστρωθούν. Μετά από καλή επαναιώρηση των κυττάρων στο θρεπτικό υλικό, ακολουθεί η επίστρωση των κυττάρων στο 96 well plate.

Σε ένα δεύτερο 96 well plate επιστρώνονται κύτταρα υπό τις ίδιες συνθήκες. Αυτό το well-plate θα χρησιμοποιηθεί για την μέτρηση των Tz κυττάρων. Τα δύο 96 well plates τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο υπό τις ίδιες συνθήκες που γίνεται η ανάπτυξη των κυττάρων.

## *3<sup>η</sup> Ημέρα:*

Την τρίτη μέρα πραγματοποιείται η επίστρωση των φαρμάκων. Αρχικά κατασκευάζονται οι διαφορετικές αραιώσεις των φαρμάκων. Έστω ότι θα μελετηθεί η επίδραση 5 διαφορετικών αραιώσεων από κάθε φάρμακο (100μM, 10μM, 1μM, 0.1μM, 0.01μM). Για την κατασκευή των αραιώσεων, γίνεται χρήση των αναστολέων συγκέντρωσης 20mM που κατασκευάστηκαν προηγουμένως. Η ποσότητα του φαρμάκου που επιστρώνεται την τρίτη ημέρα είναι αραιωμένη σε θρεπτικό υλικό όγκου 100μl. Δηλαδή, ο τελικός όγκος μετά την προσθήκη του φαρμάκου θα ανέρχεται στα 200μl σε κάθε well. Αυτό σημαίνει πως, για τον έλεγχο της επίδρασης ενός φαρμάκου σε συγκέντρωση 100μM, η συγκέντρωση του φαρμάκου που θα προστεθεί την τρίτη μέρα θα πρέπει να είναι διπλάσια από αυτή που θα ελεγχθεί. Τα 100μl φαρμάκου που θα προστεθούν, πρέπει να έχουν συγκέντρωση 200μM. Όταν τα 100μl φαρμάκου προστεθούν στο well με τα κύτταρα, το οποίο ήδη περιέχει 100μl, τότε η συγκέντρωση του φαρμάκου θα μειωθεί αυτόματα στη μέση, με αποτέλεσμα

τα 200μM του φαρμάκου να μετατραπούν σε 100μM. Σκοπός λοιπόν είναι η κατασκευή διαδοχικών αραιώσεων από όλα τα φάρμακα με διπλάσια συγκέντρωση από αυτήν που θα ελεγχθεί. Για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων η κάθε συγκέντρωση του φαρμάκου εφαρμόζεται σε 3 διαφορετικά wells και στο τέλος υπολογίζεται η μέση τιμή. Σε έξι wells από το 96 well plate δεν γίνεται προσθήκη αναστολέων αλλά αντίθετα προστίθεται 100μl θρεπτικό υλικό. Τα wells αυτά θα χρησιμοποιηθούν για τον έλεγχο της ανάπτυξης των κυττάρων απουσία αναστολέων κατά τη λήξη του πειράματος. Με την ολοκλήρωση των παραπάνω διαδικασιών, το πρώτο 96 well plate επιστρέφεται στον επωαστικό κλίβανο.

Στο δεύτερο 96 well plate που επιστρώθηκαν κύτταρα τη δεύτερη ημέρα, προστίθεται σε κάθε well 100μl θρεπτικό υλικό. Έπειτα, ακολουθεί η προσθήκη 50μl 10% TCA (Trichloroacetic acid) θερμοκρασίας 4°C. Το TCA έχει την ικανότητα να μονιμοποιεί τα κύτταρα στον πάτο των wells και φυσικά διακόπτει την ανάπτυξη τους. Το δεύτερο plate, που περιέχει τα μονιμοποιημένα κύτταρα, πρέπει να διατηρηθεί σε θερμοκρασία 4°C για μία ώρα. Με το τέλος της μίας ώρας, το plate ξεπλένεται 5 φορές με νερό βρύσης έτσι ώστε να απομακρυνθούν το TCA, το θρεπτικό υλικό και οι χαμηλού μοριακού βάρους μεταβολίτες. Έπειτα, το plate στεγνώνει στον αέρα και αποθηκεύεται για μεταγενέστερη χρήση.

#### *4<sup>η</sup> Ημέρα:*

Την τέταρτη ημέρα δεν ακολουθείται καμία διαδικασία καθώς τα κύτταρα που αναπτύσσονται στο πρώτο plate πρέπει να επωαστούν μαζί με τον αναστολέα για 48 ώρες.

#### *5<sup>η</sup> Ημέρα:*

Η πέμπτη μέρα ξεκινάει με την μονιμοποίηση των κυττάρων του πρώτου 96 well plate. Όπως προηγουμένως, προστίθενται σε όλα τα wells (με ή χωρίς αναστολέα) 50μl 10% TCA θερμοκρασίας 4°C. Το plate διατηρείται σε θερμοκρασία 4°C για μία ώρα. Ακολουθεί έκπλυση του 5 φορές με νερό βρύσης έτσι ώστε να απομακρυνθούν το TCA, το θρεπτικό υλικό και οι χαμηλού μοριακού βάρους μεταβολίτες. Το plate αφήνεται να στεγνώσει στον αέρα. Έτσι, αυτή τη χρονική στιγμή και τα δύο plates έχουν τα κύτταρα τους μονιμοποιημένα στο πάτο των wells. Στο δεύτερο plate η ανάπτυξη των κυττάρων διακόπηκε πριν την έναρξη της δράσης των αναστολέων (Χρονική στιγμή 0 – Tzero), ενώ στο πρώτο plate, η ανάπτυξη



διακόπηκε έπειτα από την εφαρμογή των αναστολέων για 2 ημέρες. Στο πρώτο plate επίσης υπάρχουν wells που δεν έχουν δεχθεί αναστολέα (control wells).

Ακολουθεί η προσθήκη χρωστικής 50  $\mu$ l Sulforhodamine B (SRB) 0.4 % (w/v) σε 1% οξικό οξύ και στα δύο 96 well plates. Η χρωστική έχει την ικανότητα να διεισδύει στα κύτταρα και να προσδένεται στις πρωτεΐνες. Τα plates επωάζονται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά τη χρώση, η μη δεσμευμένη χρωστική απομακρύνεται με πέντε εκπλύσεις χρησιμοποιώντας 1% οξικό οξύ. Στη συνέχεια τα plates στεγνώνουν στον αέρα. Επόμενο βήμα είναι η απελευθέρωση της δεσμευμένης χρωστικής από τα κύτταρα. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, για την εξαγωγή της χρωστικής απαιτούνται ελαφρά βασικές συνθήκες. Για αυτόν τον λόγο προστίθεται σε κάθε well 150 $\mu$ l Trizma Base 10mM και τα plates επωάζονται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 37° C. Έτσι, η χρωστική εξέρχεται από τα κύτταρα και αναμιγνύεται με το Trizma Base. Όσα περισσότερα κύτταρα είναι προσκολλημένα σε κάθε well, τόσο περισσότερη χρωστική έχει συνδεθεί σε αυτά και εξαχθεί με το Trizma Base. Τελευταίο είναι το στάδιο της φωτομέτρησης. Η οπτική απορρόφηση διαβάζεται σε ένα αυτοματοποιημένο αναγνώστη πλακών σε μήκος κύματος 540 nm. Είναι γεγονός πως όσο περισσότερη ποσότητα χρωστικής είναι διαλυμένη στο Trizma Base, τόσο μεγαλύτερη θα είναι και η οπτική πυκνότητα στο εκάστοτε well. Τα αποτελέσματα της οπτικής απορρόφησης μεταφέρονται στο υπολογιστή σε λογισμικό Microsoft Excel. Εκεί εισάγεται η οπτική απορρόφηση των:

- Tz wells: Wells όπου η ανάπτυξη των κυττάρων διακόπηκε πριν τη χορήγηση των αναστολέων
- Control wells: Wells όπου τα κύτταρα αναπτύχθηκαν φυσιολογικά μέχρι την ολοκλήρωση του πειράματος
- Inhibitor wells: Wells όπου επωάστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις του αναστολέα μέχρι την ολοκλήρωση του πειράματος

Τίθεται ως 100% η ανάπτυξη των κυττάρων χωρίς την παρουσία αναστολέα (Control) και ως 0% η ανάπτυξη των κυττάρων πριν τη χορήγηση του αναστολέα (Tz). Το ποσοστό της ανάπτυξης σε κάθε ένα από τα επίπεδα συγκεντρώσεων του αναστολέα (Ti) υπολογίζεται με τον εξής υπολογισμό:

$$\frac{[(Ti-Tz)/(C-Tz)] \times 100}{\text{για συγκεντρώσεις στις οποίες ισχύει } Ti \geq Tz}$$

$$\frac{[(Ti-Tz)/Tz] \times 100}{\text{για συγκεντρώσεις στις οποίες ισχύει } Ti < Tz.}$$



Μια τιμή 100 δηλώνει μηδενική αναστολή της ανάπτυξης. Μια τιμή 40 δηλώνει 60% αναστολή της ανάπτυξης. Η τιμή 0 δηλώνει μηδενική καθαρή αύξηση κατά τη διάρκεια του πειράματος. Μια τιμή -40 θα σήμαινε 40% θνησιμότητα. Η τιμή -100 δηλώνει ότι όλα τα κύτταρα είναι νεκρά.

Επιπλέον, με βάση τα παραπάνω στοιχεία υπολογίζονται τρεις βασικές παράμετροι απόκρισης κάθε δόσης. Οι παράμετροι αυτοί είναι οι εξής:

- *GI50* (Growth Inhibition of 50 %): Αναφέρεται στη δόση του αναστολέα που προκαλεί 50% μείωση της αύξησης της καθαρής πρωτεΐνης, συγκρίνοντας τη με τα κύτταρα του control  $\frac{[(Ti-Tz)/(C-Tz)] \times 100}{= 50}$
- *TGI* (Total Growth Inhibition): Αναφέρεται στη συγκέντρωση του αναστολέα που οδηγεί σε ολική αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων  $Ti = Tz$
- *LC50* (Lethal Concentration of 50%): Αναφέρεται στη συγκέντρωση του αναστολέα που οδηγεί σε 50% μείωση της πρωτεΐνης συγκρινόμενη με αυτή πριν τη χορήγηση του αναστολέα  $\frac{[(Ti-Tz)/Tz] \times 100}{= -50}$

Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο κυτταροτοξικότητας (SRB Assay) είναι μία ελαφρώς τροποποιημένη μορφή του πρωτοκόλλου που προτείνει το NCI (National Cancer Institute) ([https://dtp.cancer.gov/discovery\\_development/nci-60/methodology.htm](https://dtp.cancer.gov/discovery_development/nci-60/methodology.htm)).

#### E.8. Εξαγωγή πρωτεϊνών από κυτταρικές σειρές

Η έναρξη της διαδικασίας είναι ίδια με αυτής της ανακαλλιέργειας μέχρι το στάδιο της τρυψινοποίησης. Έπειτα από την αποκόλληση των κυττάρων ακολουθεί η προσθήκη θρεπτικού υλικού για την απενεργοποίηση της τρυψίνης. Το υλικό μεταφέρεται σε ειδικό σωλήνα κι φυγοκεντρείται στις 1200 στροφές για πέντε λεπτά. Προηγουμένως έχει γίνει καταμέτρηση των κυττάρων ώστε να είναι γνωστός ο αριθμός που υπάρχει στο ίζημα. Έπειτα απομακρύνεται το υπερκείμενο και προστίθεται στο υπάρχον ίζημα PBS 1x ώστε να ξεπλυθούν τα κύτταρα. Με την ολοκλήρωση της επαναιώρησης των κυττάρων στο PBS ακολουθεί φυγοκέντρωση στις ίδιες συνθήκες. Επαναλαμβάνεται η απομάκρυνση του υπερκείμενου και η επαναιώρηση των κυττάρων σε νέο PBS. Τέλος φυγοκεντρείται ξανά το υλικό και απομακρύνεται το υπερκείμενο έτσι ώστε στο σωλήνα να υπάρχει μόνο το ίζημα (κύτταρα). Σε αυτήν την κατάσταση, τα κύτταρα μπορούν να αποθηκευτούν σε καταψύκτη -80° C.

Επόμενο στάδιο είναι η λύση των κυττάρων και η εξαγωγή των πρωτεϊνών από τα κύτταρα που έχουν αποθηκευτεί. Για την λύση των κυττάρων είναι απαραίτητη η παρασκευή ειδικού διαλύματος (Cell Lysis Buffer) με τα εξής υλικά:

- *Ripa 10x*
- *Phosphatase Inhibitor Cocktail 100x*
- *Protease Inhibitor Cocktail 100x*

Η αγορά των υλικών έγινε από τη Cell Signaling Technology.

*Ripa 10x*: είναι το βασικό συστατικό για την λύση των κυττάρων. Το Ripa σε αραιώση 1x περιέχει μία πληθώρα υποπροϊόντων για τη λύση των κυττάρων:

- 20 mM Tris-HCl (pH 7.5)
- 150 mM NaCl,
- 1 mM Na<sub>2</sub> EDTA
- 1 mM EGTA
- 1% NP-40
- 1% sodium deoxycholate
- 2.5 mM sodium pyrophosphate
- 1 mM b-glycerophosphate
- 1 mM Na<sub>3</sub> VO<sub>4</sub>
- 1 µg/ml leupeptin

*Protease Inhibitor Cocktail*: Προκειμένου να μελετηθούν οι πρωτεΐνες της κυτταρικής σειράς είναι απαραίτητο να αποφευχθεί η αποδόμηση τους από τις πρωτεάσες. Κατά τη διάρκεια της κυτταρικής λύσης, απελευθερώνονται πρωτεάσες οι οποίες μπορούν να αποδημήσουν τις πρωτεΐνες σε ανεξέλεγκτο βαθμό. Η προσθήκη αναστολέων πρωτεάσης στο Cell Lysis Buffer βοηθά στη διατήρηση των πρωτεϊνών.

*Phosphatase Inhibitor Cocktail*: Η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών είναι ένας βασικός μηχανισμός κυτταρικής σηματοδότησης με τον οποίο ρυθμίζεται ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών διεργασιών. Προκειμένου να μελετηθεί η κατάσταση φωσφορυλίωσης συγκεκριμένων πρωτεϊνών είναι απαραίτητο τα φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα να μείνουν ανέπαφα. Όταν τα κύτταρα λύνονται, απελευθερώνονται φωσφατάσες οι οποίες οδηγούν σε αποφωσφορυλίωση των πρωτεϊνών. Η προσθήκη αναστολέων

φωσφατάσης ενισχύει τη διατήρηση των φωσφορυλιωμένων κατάλοιπων κατά τη κυτταρική λύση.

Η διάλυση των Ripa 10x, Phosphatase Inhibitor Cocktail 100x και Protease Inhibitor Cocktail 100x γίνεται σε ddH<sub>2</sub>O με σκοπό την παρασκευή διαλύματος 1x (για όλους τους παράγοντες). Τα κύτταρα, στη μορφή τους είτε ως ίζημα είτε διαλυμένα στο Cell Lysis Buffer, πρέπει να βρίσκονται πάντα μες στο πάγο ώστε να αποφευχθούν τυχόν αλλοιώσεις. Ανάλογα με το ποσό των κυττάρων που υπάρχουν στο ίζημα, προστίθεται το αντίστοιχο ποσό Cell Lysis Buffer. Γενικά ισχύει ότι, για κάθε ένα εκατομμύριο κύτταρα προστίθενται 60μl Cell Lysis Buffer. Ύστερα από την προσθήκη του Lysis Buffer στα κύτταρα, το υλικό μετακινείται σε σωληνάκια Eppendorf. Τα σωληνάκια Eppendorf πρέπει να είναι τοποθετημένα πάντα στο πάγο. Για την λύση των κυττάρων, το Lysis Buffer πρέπει να δράσει τουλάχιστον για 30 λεπτά. Κάθε πέντε λεπτά κατά τη διάρκεια του μισάωρου, τα eppendorfs τοποθετούνται στη συσκευή Vortex Mixer για 10 δευτερόλεπτα με σκοπό την ανάμιξη των υλικών. Με την ολοκλήρωση του μισάωρου, τα eppendorfs φυγοκεντρούνται για 10 λεπτά στις 13.000 στροφές σε θερμοκρασία 4° C. Έπειτα, το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο eppendorf και το υπερκείμενο επαναφυγοκεντρείται υπό τις ίδιες συνθήκες. Το νέο υπερκείμενο αποθηκεύεται σε νέο eppendorf. Είναι σημαντικό να ελεγχθεί η καθαρότητα του νέου υπερκείμενου. Αν το υπερκείμενο είναι καθαρό, η διαδικασία ολοκληρώνεται εδώ. Αν το υπερκείμενο δεν είναι διαυγές, τότε επαναλαμβάνονται οι φυγοκεντρήσεις μέχρι να ‘καθαρίσει’ το υπερκείμενο. Το νέο αυτό eppendorf περιέχει τις πρωτεΐνες των κυττάρων που λύθηκαν.

### E.9. Ανάλυση Bradford

Η ανάλυση Bradford είναι μία τεχνική που επιτρέπει την εξακρίβωση της συγκέντρωσης πρωτεΐνης που περιέχεται σε κάθε δείγμα. Για την εύρεση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών είναι απαραίτητη η κατασκευή μίας πρότυπης καμπύλης. Η πρότυπη καμπύλη κατασκευάζεται χρησιμοποιώντας δείγματα που περιέχουν γνωστές συγκεντρώσεις πρωτεϊνών. Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε το Pierce™ BCA Protein Assay Kit. Το Kit περιέχει τα εξής προϊόντα:

- BCA αντιδραστήριο A, 2 x 500 mL
- BCA αντιδραστήριο B, 25 mL
- Αμπούλες Αλβουμίνης συγκέντρωσης 2mg/mL

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης παρασκευάζονται διαδοχικές αραιώσεις της αλβουμίνης. Η αραιώση γίνεται σε RIPA 1x και PBS 1x (1/5 RIPA 1x και 4/5 PBS 1x). Η αραιώση γίνεται σε αυτές τις αναλογίες έτσι ώστε οι συνθήκες αραιώσης της αλβουμίνης να είναι ίδιες με αυτές της αραιώσης του δείγματος που θα συζητηθούν παρακάτω. Οι αραιώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα είναι οι εξής: 2mg/mL, 1.5mg/mL, 1mg/mL, 0.75mg/mL, 0.5mg/mL, 0.25mg/mL, 0.125mg/mL.

Σε ένα 96 well plate τοποθετούνται σε 7 wells 25μl από τις παραπάνω αραιώσεις. Επειδή υπάρχει πιθανότητα το δείγμα που μελετάται να έχει μεγαλύτερη συγκέντρωση πρωτεΐνης από τα 2mg/mL που έχει η αλβουμίνη, συνίσταται η αραιώση του δείγματος που θα χρησιμοποιηθεί για την μέτρηση του σε 1/5 του αρχικού ποσού. Για αυτό το λόγο, σε ένα νέο well του 96 well plate προστίθενται 5μl του δείγματος και 20μl PBS. Ακολουθεί η προσθήκη ενός μείγματος των 2 αντιδραστηρίων (Working Reagent) που περιέχονται στο kit. Η αναλογία των δύο αντιδραστηρίων είναι η εξής: 50A:1B. Σε κάθε well, που περιέχει τις συγκεντρώσεις της αλβουμίνης όπως επίσης και στα well που περιέχουν τα δείγματα, προστίθενται 200μl του Working Reagent. Το 96 well plate τοποθετείται στον επωαστικό κλίβανο σε θερμοκρασία 37° C για μισή ώρα. Έπειτα, διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Ακολουθεί φωτομέτρηση για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων. Τα αποτελέσματα μεταφέρονται σε λογισμικό Microsoft Excel. Εκεί κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιώντας τα δεδομένα από τις διαδοχικές αραιώσεις της αλβουμίνης. Χρησιμοποιώντας την πρότυπη καμπύλη και την οπτική απορρόφηση των δειγμάτων, γίνεται ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των δειγμάτων. Είναι σημαντικό να σημειωθεί πως, ο αριθμός που προκύπτει πρέπει να πολλαπλασιαστεί με το 5 καθώς κάθε δείγμα αραιώθηκε κατά τη μεταφορά του στο 96 well plate.

#### E.10. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης – SDS

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια μέθοδος με σκοπό τον διαχωρισμό και την ανάλυση των μακρομορίων (DNA, RNA και πρωτεϊνών) και των θραυσμάτων τους με βάση το μέγεθος και το φορτίο τους και βασίζεται στο γεγονός πως ένα μόριο με καθαρό φορτίο θα μετακινηθεί σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Η ταχύτητα μετακίνησης ( $u$ ) του μορίου σε ένα ηλεκτρικό πεδίο εξαρτάται από: την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου ( $E$ ), το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης ( $z$ ) και το συντελεστή τριβής ( $f$ ):  $U = Ez/f$

Η σταθερά της τριβής εξαρτάται από την μάζα και το σχήμα του μορίου, καθώς και από την πυκνότητα του μέσου που μετακινείται. Ο ηλεκτροστατικός διαχωρισμός γίνεται σε πηκτή. Η μετακίνηση των μορίων μέσα στη πηκτή εξαρτάται από το βάρος τους. Μόρια με μικρό βάρος μετακινούνται εύκολα διά μέσου της πηκτής ενώ μόρια με μεγάλο βάρος μετακινούνται πιο αργά.

Σε μία πηκτή πολυακρυλαμίδης με αποδιατακτικές συνθήκες, οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται βάσει του μοριακού τους βάρους. Το θειικό δωδεκύλιο νάτριο (Sodium dodecyl sulfate – SDS) είναι ένα ανιοντικό απορρυπαντικό που καταστρέφει τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μίας πρωτεΐνης. Τα ανιόντα του SDS συνδέονται στις κύριες αλυσίδες σε αναλογία ενός μορίου SDS ανά δύο αμινοξέα, που δίνει στο σύμπλοκο του SDS με την αποδιαταγμένη πρωτεΐνη ένα μεγάλο φορτίο, περίπου ανάλογο με τη μάζα της. Το αρνητικό φορτίο που αποκτάται με τη δέσμευση του SDS είναι συνήθως πολύ μεγαλύτερο από το αρχικό φορτίο της πρωτεΐνης, επομένως το αρχικό φορτίο θεωρείται αμελητέο. Η μετακίνηση γίνεται σε λεπτή κατακόρυφη στιβάδα και με αυτόν τον τρόπο η μετακίνηση των πρωτεϊνών είναι απολύτως ανάλογη με το λογάριθμο της μάζας τους.

Αρχικά παρασκευάζεται η πηκτή πολυακρυλαμίδης. Η πυκνότητα της πηκτής μπορεί να διαφέρει. Πηκτή με μεγάλη πυκνότητα έχει μικρούς πόρους οδηγώντας σε πιο αργή μετακίνηση των πρωτεϊνών. Αντίθετα, πηκτή με μικρή πυκνότητα, δηλαδή με μεγαλύτερους πόρους οδηγεί σε πιο γρήγορη μετακίνηση των πρωτεϊνών. Ανάλογα με το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών που ελέγχονται, επιλέγεται η πυκνότητα της πηκτής. Η πηκτή που παρασκευάστηκε στο πείραμα είχε δύο διαφορετικές πυκνότητες. Στο άνω και μικρότερο τμήμα της (stacking gel), η πηκτή έχει πυκνότητα 5%, ενώ στο κάτω και μεγαλύτερο τμήμα της (resolving gel), η πηκτή έχει πυκνότητα 8%. Η διαφορετική πυκνότητα επιτρέπει στα δείγματα να μετακινηθούν και να στοιχηθούν έτσι ώστε η ηλεκτροφόρηση όλων των δειγμάτων να ξεκινήσει από το ίδιο σημείο (resolving gel).

Τα δείγματα φορτώνονται στη πηκτή έπειτα από την προσθήκη ενός μείγματος υλικών σε αυτά (loading buffer). Στο loading buffer περιέχεται μία πληθώρα υλικών (SDS 20%, γλυκερίνη, Trizma Base 0.5M, μπλε της βρωμοφαινόλης, β-μερκαπταιθανόλη), απαραίτητα για την ηλεκτροφόρηση. Η χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης επιτρέπει την ανίχνευση των πρωτεϊνών κατά το διαχωρισμό τους στη πηκτή. Ανάλογα με το εκάστοτε πείραμα αποφασίζεται το ποσό των μικρογραμμαρίων που θα φορτωθεί από το κάθε δείγμα. Κάθε δείγμα που

φορτώνεται πρέπει να έχει τον ίδιο όγκο με τα υπόλοιπα δείγματα. Για τον λόγο αυτό, σε δείγματα με διαφορετική συγκέντρωση πρωτεΐνης προστίθεται PBS 1x για την ισορρόπηση των όγκων. Επιπλέον, σε κάθε δείγμα φορτώνεται loading buffer ίσο με το 1/3 του όγκου του δείγματος. Πριν τη φόρτωση των δειγμάτων στη πηκτή, προηγείται αποδιάταξη των πρωτεϊνών σε θερμοκρασία 95° C για 5 λεπτά. Η πηκτή πολυακρυλαμίδης τοποθετείται σε ειδική συσκευή (η αγορά της οποίας έγινε από τη Bio-Rad). Στη συσκευή προστίθεται ειδικό διάλυμα (Running Buffer) που επιτρέπει την διεξαγωγή της ηλεκτροφόρησης. Έπειτα, ακολουθεί η φόρτωση των δειγμάτων. Στην άκρη της πηκτής φορτώνεται ο μάρτυρας. Ο μάρτυρας περιέχει πρωτεΐνες γνωστού μοριακού βάρους και θα επιτρέψει αργότερα τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών του δείγματος. Η ηλεκτροφόρηση αρχίζει με την εφαρμογή 100V για 10 λεπτά στη πηκτή (για την στοίχιση των πρωτεϊνών). Ακολουθεί εφαρμογή 200V για 40 λεπτά.

#### E.11. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών – Western Blot

Η ανοσοαποτύπωση βασίζεται στη μεταφορά των αποδιαταγμένων πρωτεϊνών σε μία ειδική επιφάνεια και στην ανίχνευση των επιλεγμένων πρωτεϊνών με τη χρήση ειδικού αντισώματος. Η επιφάνεια αυτή (μεμβράνη νιτροκυτταρίνης) επιτρέπει στις πρωτεΐνες να αντιδράσουν με το αντίσωμα. Το αντίσωμα (μονοκλωνικό αντίσωμα) ανιχνεύει ειδικά την πρωτεΐνη σαν αντιγόνο και δεσμεύεται σε αυτή. Το σύμπλοκο αντιγόνο – αντίσωμα μπορεί να ανιχνευθεί από ένα δεύτερο αντίσωμα, ειδικό για το πρώτο. Είναι σημαντικό να σημειωθεί πως, το δεύτερο αντίσωμα προέρχεται από ζώο διαφορετικό του πρώτου. Το δεύτερο αντίσωμα είναι σημασμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση της ραπανίδας (horseradish peroxidase, HRP). Η ανίχνευση γίνεται με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (enhanced chemiluminescence – ECL). Με την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή αφαιρείται από τη συσκευή και μεταφέρεται στη μεμβράνη κατασκευάζοντας μία στιβάδα. Πιο συγκεκριμένα η στιβάδα αποτελείται από:

1. Χαρτί Whitman
2. Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης
3. Πηκτή πολυακρυλαμίδης
4. Χαρτί Whitman

Η στιβάδα μεταφέρεται σε ειδική συσκευή μεταφοράς πρωτεϊνών. Η τάση που εφαρμόζεται εξαρτάται από το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών που ελέγχεται. Επειδή οι πρωτεΐνες που μελετώνται στο πείραμα είναι μεγάλες, εφαρμόζεται τάση 40V, ενώ η χρονική διάρκεια της μεταφοράς είναι καθ' όλη τη διάρκεια του βραδιού (overnight). Είναι σημαντικό να ελεγχθούν τα mA πριν ξεκινήσει η διαδικασία της μεταφοράς. Το βέλτιστο θεωρητικά αποτέλεσμα επέρχεται όταν κατά το τέλος της μεταφοράς, τα mA έχουν αυξηθεί κατά 100 μονάδες.

Αφού ολοκληρωθεί η μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, αφαιρείται η μεμβράνη από τη συσκευή. Ακολουθεί χρώση της με τη χρωστική Ponceau για τον έλεγχο της ισοφόρτωσης των δειγμάτων και της επιτυχούς μεταφοράς των πρωτεϊνών. Επιπλέον η πηκτή μπορεί να χρωματιστεί με την ειδική χρωστική Coomassie Brilliant Blue έτσι ώστε να επιβεβαιωθεί η πλήρης μεταφορά των πρωτεϊνών από τη πηκτή.

Στη συνέχεια η μεμβράνη επωάζεται σε διάλυμα κορεσμού για τον κορεσμό των θέσεων δέσμευσης πρωτεϊνών της μεμβράνης από τις πρωτεΐνες του διαλύματος. Το διάλυμα κορεσμού αποτελείται από 95% TTBS (Tween-20 Tris-Buffered Saline) και 5% FBS (Fetal Bovine Serum). Η μεμβράνη επωάζεται στο διάλυμα για μία ώρα υπό ήπια ανάδευση. Ακολουθεί επώαση της μεμβράνης καθ' όλη τη διάρκεια του βραδιού (16 με 18 ώρες) με το πρώτο αντίσωμα υπό ήπια ανάδευση. Την επόμενη ημέρα, το πρώτο αντίσωμα απομακρύνεται από τη μεμβράνη (και αποθηκεύεται σε κατάψυξη -80° C). Ακολουθούν τρεις πεντάλεπτες εκπλύσεις με TTBS και έπειτα προστίθεται το δεύτερο αντίσωμα για μία ώρα. Η μεμβράνη ξεπλένεται από το δεύτερο αντίσωμα με τρεις πεντάλεπτες εκπλύσεις TTBS.

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε το mTOR Pathway Antibody Sampler Kit #9964 της Cell Signaling Technology. Η αραίωση των αντισωμάτων (πρώτο και δεύτερο) γίνεται σε 95% TTBS και 5% FBS. Στο kit περιέχονται αντισώματα που συνδέονται με πρωτεΐνες σχετιζόμενες με το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K – Akt – mTOR. Αναλυτικά το kit περιέχει:

- Phospho-mTOR (Ser2481) Antibody (πρώτο αντίσωμα κουνελιού – Μοριακό Βάρος πρωτεΐνης: 289kDa – Προτεινόμενη αραίωση 1/1000)
- Phospho-mTOR (Ser2448) (D9C2) XP® Rabbit mAb 5536 (πρώτο αντίσωμα κουνελιού – Μοριακό Βάρος πρωτεΐνης: 289kDa – Προτεινόμενη αραίωση 1/1000)

- mTOR (7C10) Rabbit mAb 2983 (πρώτο αντίσωμα κουνελιού – Μοριακό Βάρος πρωτεΐνης: 289kDa – Προτεινόμενη αραίωση 1/1000)
- Raptor (24C12) Rabbit mAb 2280 (πρώτο αντίσωμα κουνελιού – Μοριακό Βάρος πρωτεΐνης: 150kDa – Προτεινόμενη αραίωση 1/1000)
- Rictor (53A2) Rabbit mAb 2114 (πρώτο αντίσωμα κουνελιού – Μοριακό Βάρος πρωτεΐνης: 200kDa – Προτεινόμενη αραίωση 1/1000)
- GβL (86B8) Rabbit mAb 3274 (πρώτο αντίσωμα κουνελιού – Μοριακό Βάρος πρωτεΐνης: 37kDa – Προτεινόμενη αραίωση 1/1000)
- Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody 7074 (δεύτερο αντίσωμα κασίικας ειδικό για κουνέλι – Μοριακό Βάρος πρωτεΐνης: 37kDa – Προτεινόμενη αραίωση 1/6000)

Για τον έλεγχο της ισοφόρτωσης μεταξύ των δειγμάτων, μελετάται το ποσό της έκφρασης μίας κατηγορίας πρωτεϊνών (Housekeeping proteins). Αυτές οι πρωτεΐνες εκφράζονται σε όλα τα κύτταρα στον ίδιο βαθμό (loading control). Ελέγχοντας το ποσοστό έκφρασης των πρωτεϊνών αυτών σε κάθε δείγμα, μπορεί να επιβεβαιωθεί η ισοφόρτωση των δειγμάτων. Στο συγκεκριμένο πείραμα μελετήθηκε η πρωτεΐνη GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase). Η αγορά του πρώτου αντισώματος (προερχόμενο από ποντίκι) για το GAPDH έγινε από την Biolegend. Το μοριακό βάρος του GAPDH είναι 37kDa με προτεινόμενη αραίωση 1/5000. Η αγορά για το δεύτερο αντίσωμα, ειδικό για το πρώτο αντίσωμα ποντικίου έγινε από την Sigma και χρησιμοποιήθηκε σε αραίωση 1/6000.

Στο τελευταίο στάδιο πραγματοποιείται η εμφάνιση του αποτελέσματος μέσω της τεχνικής της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας. Η μεμβράνη επώάζεται σε διάλυμα λουμινόλης και κουμαρικού οξέος. Το kit που χρησιμοποιήθηκε και περιείχε τα αντιδραστήρια είναι το Pierce ECL Western Blotting Substrate της Thermo Fisher Scientific. Η συζευγμένη με το δεύτερο αντίσωμα υπεροξειδάση αντιδρά με το υπεροξείδιο δημιουργώντας ρίζες υπεροξειδίου, οι οποίες αντιδρούν με τον ενισχυτή της χημειοφωταύγειας κουμαρικό οξύ δημιουργώντας ρίζες κουμαρικού οξέος. Αυτές με τη σειρά τους οξειδώνουν τη λουμινόλη σε 3-αμινο-φθαλικό, ουσία η οποία εκπέμπει φως. Στη συνέχεια η μεμβράνη τοποθετείται σε ειδική συσκευή (Uvitec Cambridge) και εκτίθεται σε ακτινοβολία UV. Τα αποτελέσματα ψηφιοποιούνται και μεταφέρονται στον ηλεκτρονικό υπολογιστή μέσω του λογισμικού Alliance. Στο λογισμικό Alliance, ο χρήστης μπορεί να επεξεργαστεί τα δεδομένα του, να αλλάξει



τον χρόνο έκθεσης της μεμβράνης στην ακτινοβολία και να αποθηκεύσει την εικόνα σε διάφορους τύπους αρχείων.



Εικόνα 9: Έλεγχος της έκφρασης της πρωτεΐνης GAPDH σε διαφορετικές χρονικές στιγμές.

([http://www.novusbio.com/GAPDH-Antibody-2D4A7\\_NB300-328H.html](http://www.novusbio.com/GAPDH-Antibody-2D4A7_NB300-328H.html))

Πολλές φορές είναι απαραίτητη η σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών διαφορετικών δειγμάτων. Ο έλεγχος γίνεται συγκρίνοντας την ένταση και το μέγεθος της εκάστοτε λωρίδας κάθε δείγματος. Είναι λογικό πως, όσο πιο έντονο είναι το χρώμα και όσο πιο μεγάλη είναι η λωρίδα, τόσο μεγαλύτερο είναι το επίπεδο έκφρασης της πρωτεΐνης. Έτσι, χρησιμοποιώντας το λογισμικό ImageJ, μπορεί να γίνει σύγκριση, κανονικοποίηση και ποσοτικοποίηση της έκφρασης των πρωτεϊνών μεταξύ των δειγμάτων. Αρχικά γίνεται διαίρεση μεταξύ της πρωτεΐνης που μελετάται και του GAPDH για το πρώτο δείγμα (διαδικασία κανονικοποίησης). Στη συνέχεια πραγματοποιείται η ίδια διαδικασία για τα επόμενα δείγματα. Τα αποτελέσματα τοποθετούνται σε διάγραμμα και συγκρίνονται. Για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων, πραγματοποιούνται δύο ανοσοαποτυπώσεις και σαν αποτέλεσμα χρησιμοποιείται ο μέσος όρος των τιμών. Για τις πρωτεΐνες phospho-mtor (ser 2448), total mtor, Rictor και Raptor πραγματοποιήθηκαν δύο ανοσοαποτυπώσεις. Για την Gβ1 πραγματοποιήθηκε μία ανοσοαποτύπωση.

## ΣΤ. Αποτελέσματα

**ΣΤ.1. Προσδιορισμός των GI50, TGI και LC50 των αναστολέων Everolimus, Temsirolimus, Deforolimus, XL388, AZD2014, AZD8055 για τις κυτταρικές σειρές 8505C και PTC με την τεχνική ανάλυσης κυτταροτοξικότητας SRB.**

Χρησιμοποιώντας την τεχνική ανάλυσης SRB προσδιορίστηκε ο ρυθμός ανάπτυξης των κυττάρων όπως επίσης και οι GI50, TGI και LC50 για τις παραπάνω κυτταρικές σειρές. Βρέθηκε πως όλοι οι αναστολείς προκαλούν μείωση του ρυθμού της ανάπτυξης των κυττάρων, κάποιοι εκ των οποίων είχαν σημαντικές αποκλίσεις στον τρόπο δράσης τους.

Ακολουθεί η παρουσίαση των αποτελεσμάτων του ρυθμού ανάπτυξης των κυττάρων. Το 100% υποδηλώνει πως ο αναστολέας δεν είχε καμία επίδραση στην ανάπτυξη των κυττάρων. Το 0% υποδηλώνει πως ο αναστολέας οδήγησε σε ολική αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων. Το μείον (-)% υποδηλώνει πως ο αναστολέας οδήγησε σε θανάτωση των κυττάρων.

	Everolimus	Temsirolimus	Deforolimus	XL388	AD2014	AZ8055
100μM	-47,2%	-69,3%	-46,5%	-0,5%	-8,5%	-12,6%
10μM	54,2%	-36,9%	31,9%	14,1%	7,0%	8,2%
1μM	76,9%	69,7%	69,0%	98,0%	11,9%	8,9%
0,1μM	72,9%	76,7%	68,5%	117,2%	77,2%	21,8%
0,01μM	75,6%	74,6%	70,1%	103,6%	106,2%	70,3%

Πίνακας 1: Ανάλυση της επίδρασης των αναστολέων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις στο ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων της κυτταρικής σειράς 8505C.

	Everolimus	Temsirolimus	Deforolimus	XL388	AD2014	AZ8055
100μM	-35,1%	-61,7%	-30,5%	-16,9%	-2,7%	-14,5%
10μM	62%	-23,3%	51,7%	33,4%	32,3%	26,9%
1μM	88,8%	78,6%	72,9%	75,2%	46,5%	29,7%
0,1μM	90,6%	89,1%	83,1%	95,9%	79,3%	44,5%
0,01μM	102,4%	98,4%	101,3%	103%	100,3%	89,7%

Πίνακας 2: Ανάλυση της επίδρασης των αναστολέων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις στο ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων της κυτταρικής σειράς PTC.

#### Επίδραση αναστολέων πρώτης γενιάς στη κυτταρική σειρά 8505C:

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των αναστολέων για κάθε κυτταρική σειρά γίνεται κατανοητό πως οι αναστολείς Everolimus, Temsirolimus και Deforolimus παρουσιάζουν έναν παρόμοιο τρόπο δράσης (αναστολείς πρώτης γενιάς). Στη κυτταρική σειρά 8505C, οι αναστολείς πρώτης γενιάς στη συγκέντρωση 0.01μM παρουσιάζουν αναστολή περίπου 25% της ανάπτυξης των κυττάρων. Το επίπεδο της αναστολής δεν αλλάζει για τις συγκεντρώσεις 0.1μM και 1μM καθώς διατηρούνται σε παρόμοια επίπεδα (30% αναστολή ανάπτυξης). Για τις επόμενες δύο συγκεντρώσεις (10μM και 100μM) τα επίπεδα αναστολής μεταξύ των αναστολέων διαφοροποιούνται. Πιο συγκεκριμένα τα Everolimus και Deforolimus παρουσίασαν αναστολή της ανάπτυξης κατά 32% και 52% για την συγκέντρωση 10μM ενώ οι ίδιοι αναστολείς οδήγησαν σε θανάτωση των κυττάρων σε ποσοστό περίπου 45% στη συγκέντρωση 100μM. Το Temsirolimus προκάλεσε θανάτωση των κυττάρων κατά 40% και 70% για τις συγκεντρώσεις 10μM και 100μM αντίστοιχα.

#### Επίδραση αναστολέων πρώτης γενιάς στη κυτταρική σειρά PTC:

Οι αναστολείς πρώτης γενιάς εμφανίζουν μικρότερη αποτελεσματικότητα στα PTC συγκρίνοντας τα με τα 8505C. Στη συγκέντρωση 0,01μM, οι αναστολείς παρουσιάζουν από ελάχιστη έως μηδαμινή δραστηριότητα. Στις συγκεντρώσεις 0,1μM και 1μM, εμφανίζεται μία μικρή αναστολή ανάπτυξης, της τάξης του 20%. Όπως και στη κυτταρική σειρά 8505C, το Temsirolimus εμφανίζει μεγαλύτερη δραστηριότητα, οδηγώντας σε θανάτωση των κυττάρων κατά 25% και 60% για τις συγκεντρώσεις 10μM και 100μM αντίστοιχα. Τα Everolimus και Deforolimus οδήγησαν σε αναστολή της ανάπτυξης κατά 60% και 50% για την συγκέντρωση 10μM ενώ οι ίδιοι αναστολείς οδήγησαν σε θανάτωση των κυττάρων σε ποσοστό περίπου 30% στη συγκέντρωση 100μM.

#### Αναστολείς δεύτερης γενιάς

Οι αναστολείς δεύτερης γενιάς (XL388, AZD2014, AZD8055) δεν εμφανίζουν όμοιο μοτίβο δράσης μεταξύ τους, όπως οι αναστολείς πρώτης γενιάς. Στη συγκέντρωση 0,01μM, οι αναστολείς δεύτερης γενιάς παρουσιάζουν μηδαμινή αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων και για τις δύο κυτταρικές σειρές. Επίσης οι αναστολείς δεύτερης γενιάς εμφανίζουν μία πιο ομοιόμορφη αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων μεταξύ των πέντε διαφορετικών συγκεντρώσεων συγκρινόμενοι με τους

αναστολείς πρώτης γενιάς. Ένα επιπλέον χαρακτηριστικό των αναστολέων δεύτερης γενιάς είναι πως, ακόμη και στη συγκέντρωση 100μM, παρουσιάζουν ελάχιστη θανάτωση των κυττάρων συγκρινόμενοι με τους αναστολείς πρώτης γενιάς.

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων υπολογίσθηκαν οι τιμές των:

1. GI50: Συγκέντρωση που αναστέλλει την ανάπτυξη στο 50% των κυττάρων
2. TGI: Συγκέντρωση που αναστέλλει την ανάπτυξη όλων των κυττάρων
3. LC50: Συγκέντρωση που σκοτώνει το 50% των κυττάρων

	<b>GI50</b>	<b>TGI</b>	<b>LC50</b>
<u>Everolimus</u>	13,7μM	58,1μM	102,5μM
<u>Temsirolimus</u>	2,7μM	6,9μM	46,4μM
<u>Deforolimus</u>	5,6μM	46,6μM	104μM
<u>XL388</u>	6,2μM	97,1μM	>100μM
<u>AZD2014</u>	0,5μM	50,6μM	>100μM
<u>AZD8055</u>	0,05μM	45,6μM	>100μM

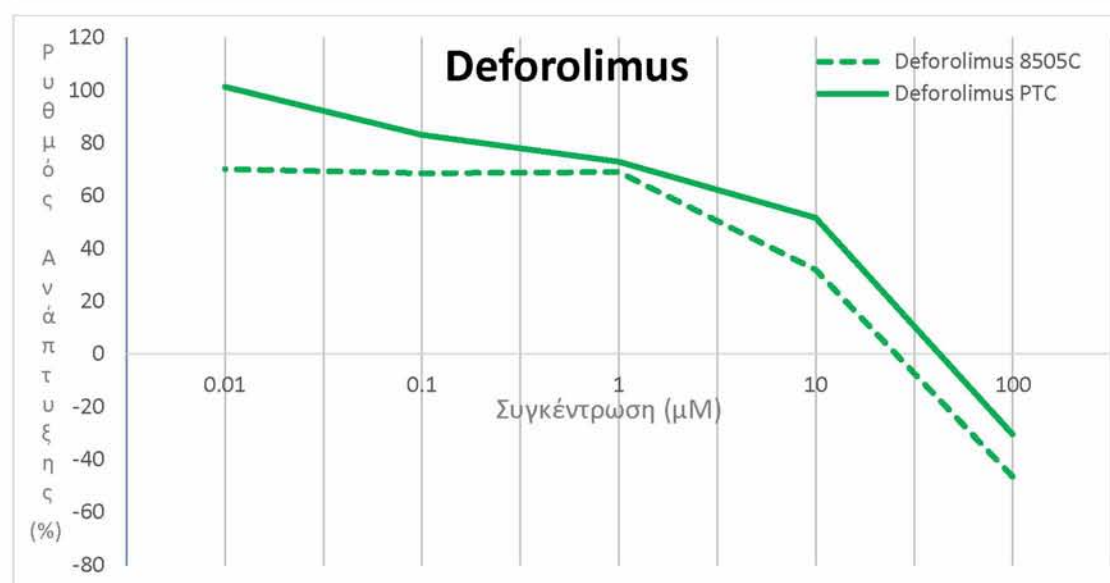
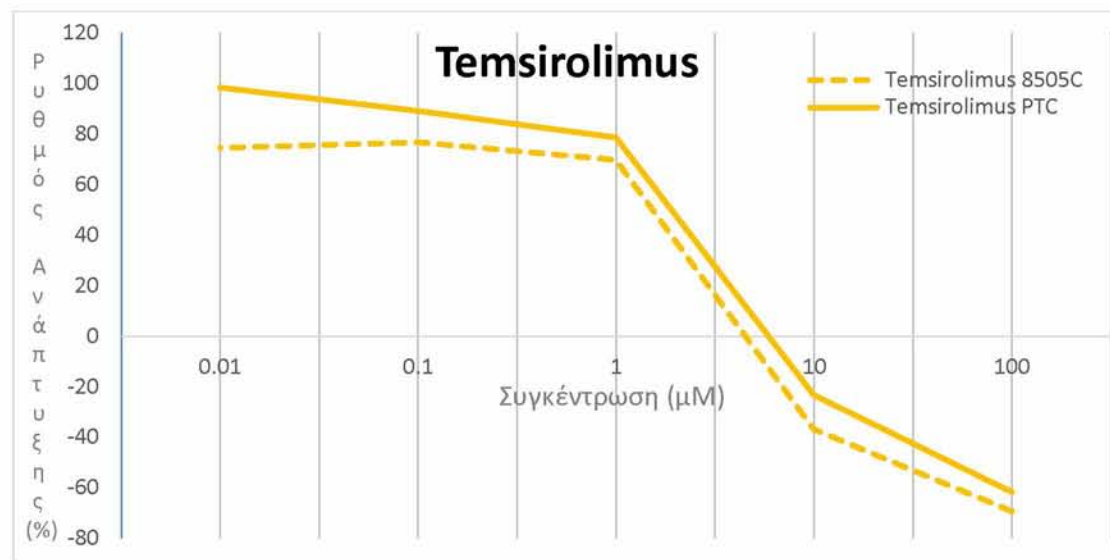
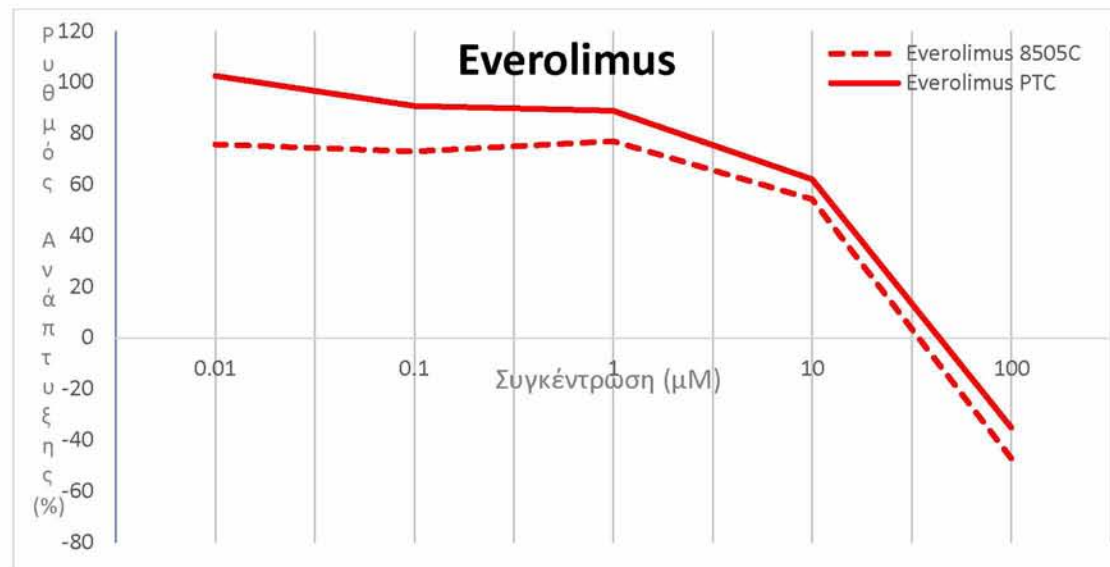
Πίνακας 3: Παρουσίαση των GI50, TGI και LC50 για την κυτταρική σειρά 8505C

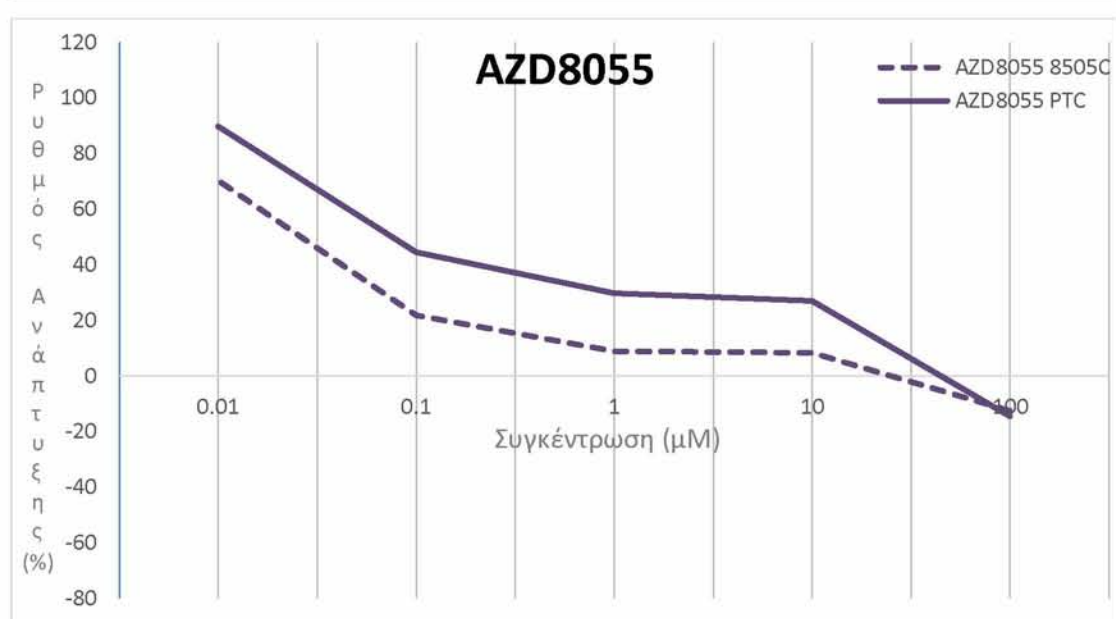
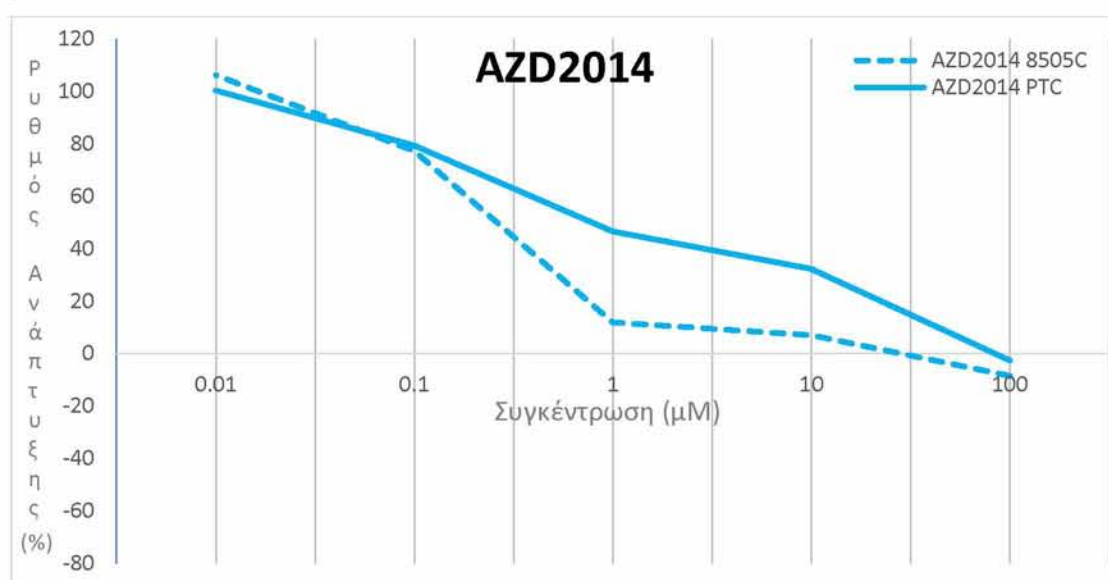
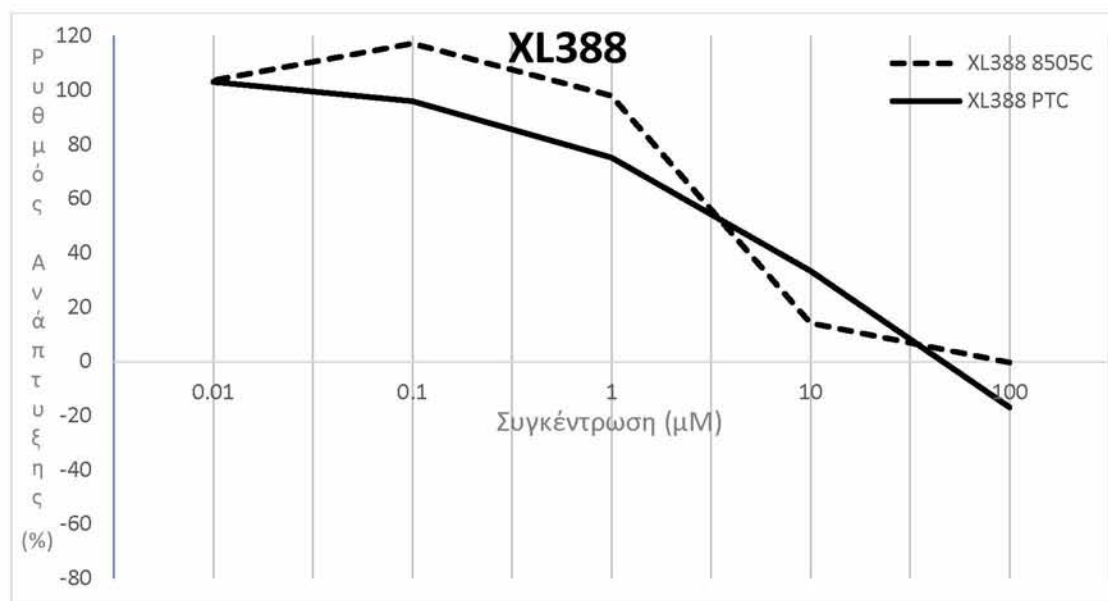
	<b>GI50</b>	<b>TGI</b>	<b>LC50</b>
<u>Everolimus</u>	21,1μM	67,5μM	>100μM
<u>Temsirolimus</u>	3,5μM	7,9μM	72,5 μM
<u>Deforolimus</u>	11,8μM	66,6μM	>100μM
<u>XL388</u>	6,4μM	69,8 μM	>100μM
<u>AZD2014</u>	0,9μM	93,1 μM	>100μM
<u>AZD8055</u>	0,1μM	68,5 μM	>100μM

Πίνακας 4: Παρουσίαση των GI50, TGI και LC50 για την κυτταρική σειρά PTC

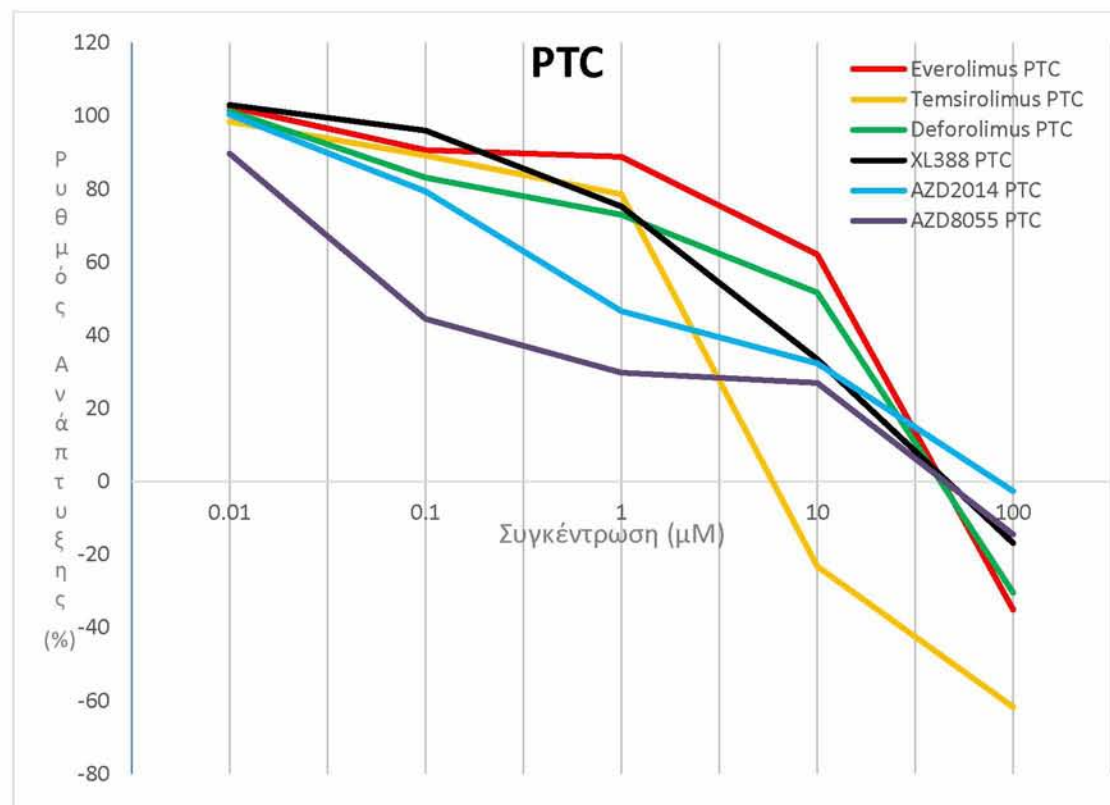
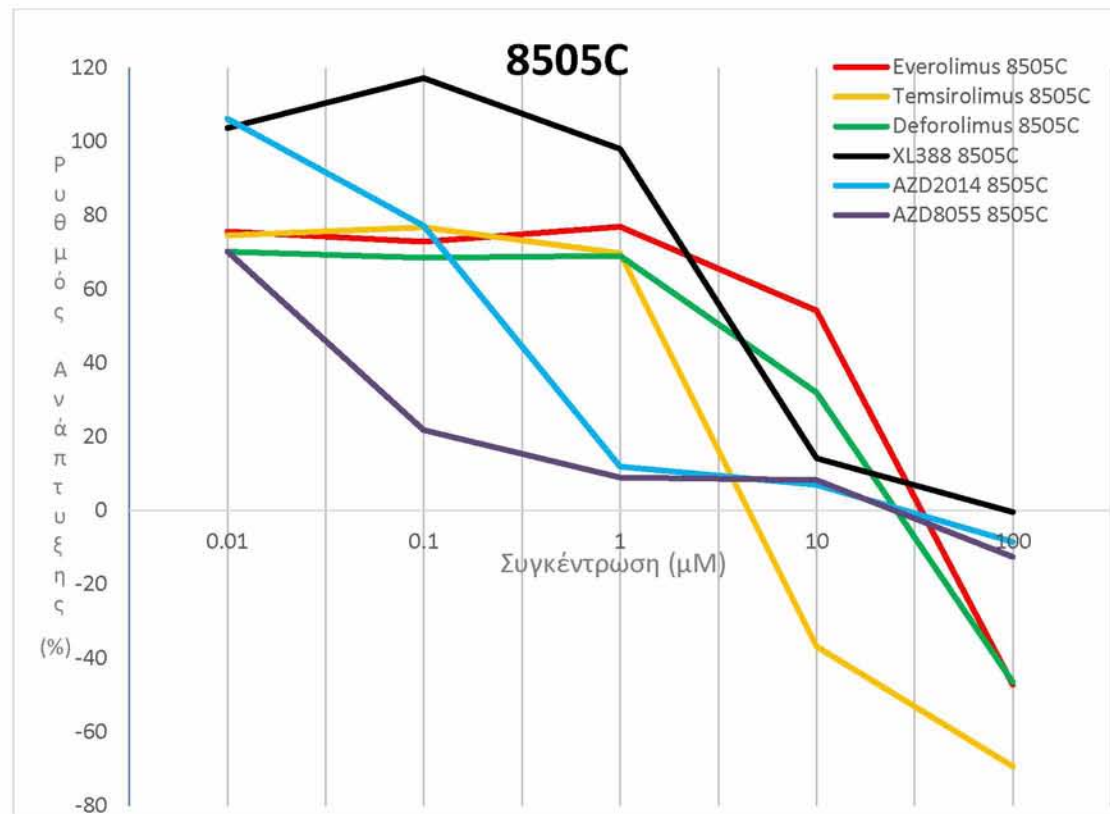
Από την ανάλυση των παραπάνω αποτελεσμάτων, κατασκευάστηκαν γραφικές παραστάσεις για τους έξι αναστολείς. Ο οριζόντιος άξονας περιέχει τις 5 διαφορετικές συγκεντρώσεις των αναστολέων (100μM, 10μM, 1μM, 0.1μM, 0.01μM). Ο κάθετος άξονας αντικατοπτρίζει τον ρυθμό της ανάπτυξης των κυττάρων. Αρνητικός αριθμός συμβολίζει θάνατο των κυττάρων.

Για την σύγκριση της επίδρασης κάθε αναστολέα μεταξύ των δύο κυτταρικών σειρών κατασκευάστηκαν οι εξής γραφικές παραστάσεις:





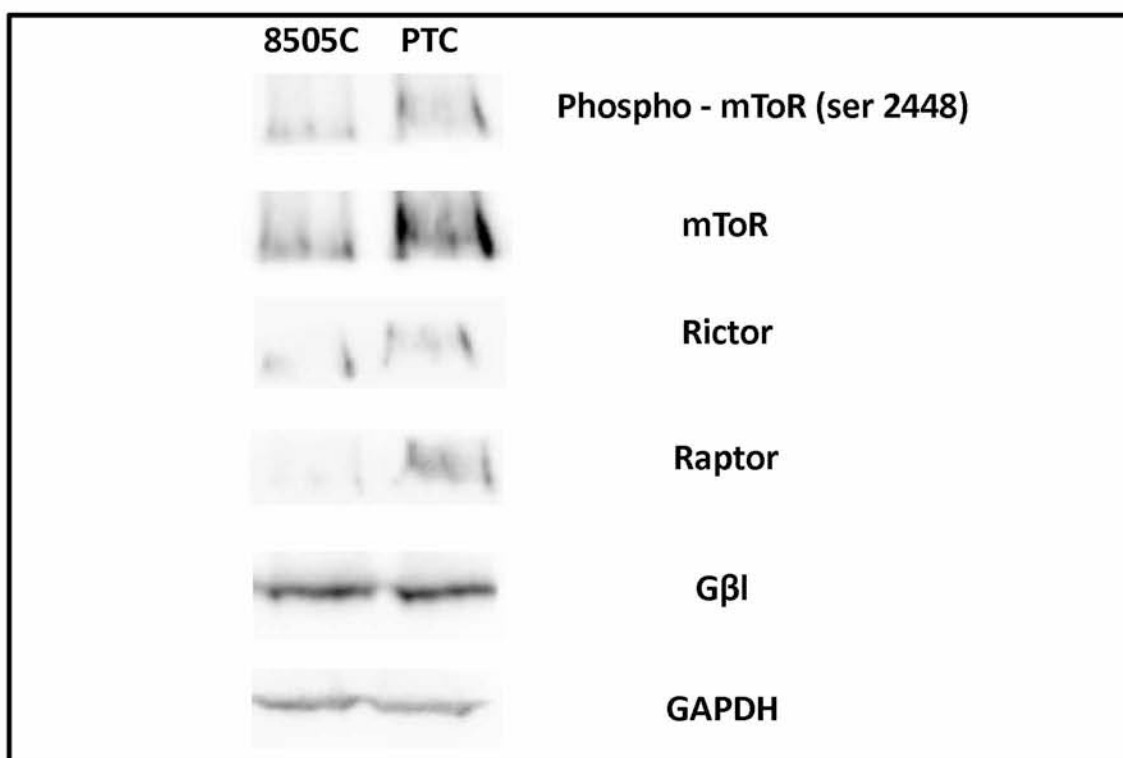
Για την σύγκριση της αποτελεσματικότητας των αναστολέων σε κάθε κυτταρική σειρά μεμονωμένα κατασκευάστηκαν οι παρακάτω γραφικές παραστάσεις.





**ΣΤ.2. Προσδιορισμός και ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών mToR (total), phospho-mToR (Ser 2448), phospho-mToR (Ser 2481), Rictor, Raptor και Gβ1 για τις κυτταρικές σειρές 8505C και PTC**

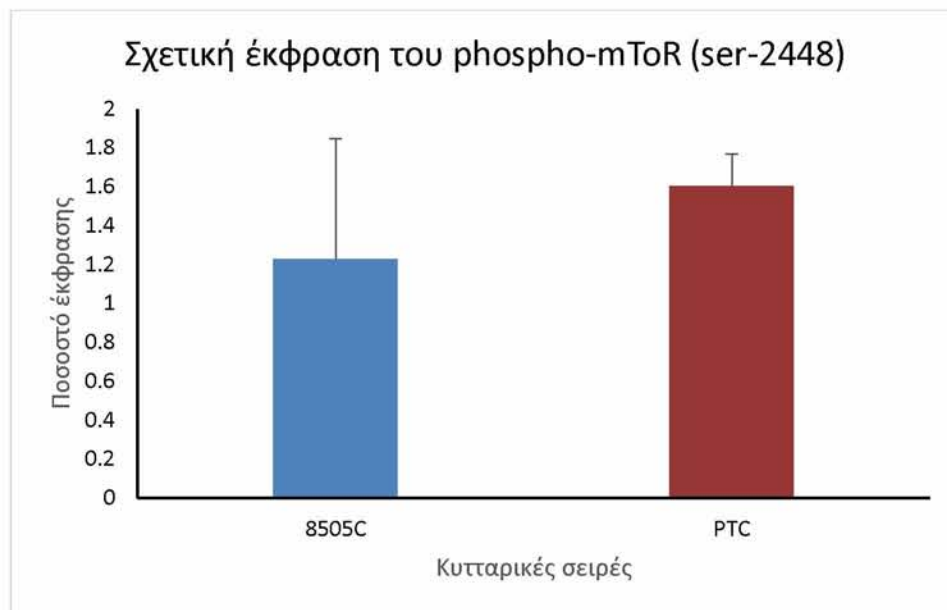
Η ανίχνευση των πρωτεϊνικών επιπέδων των mToR (total), phospho-mToR (Ser 2448), phospho-mToR (Ser 2481), Rictor, Raptor και Gβ1 πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν δείχνουν ότι, οι πρωτεΐνες mToR, phospho-mToR (Ser 2448), Rictor, Raptor και Gβ1 εκφράζονται και στις δύο κυτταρικές σειρές, αν και φαίνεται να υπάρχει σημαντική διαφορά στα επίπεδα έκφρασης τους. Η phospho-mToR (Ser 2481) δεν ανιχνεύθηκε σε καμία από τις κυτταρικές σειρές. Για τον προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης φορτώθηκαν, σε κάθε πηγαδάκι της πηκτής 20μg πρωτεΐνης.



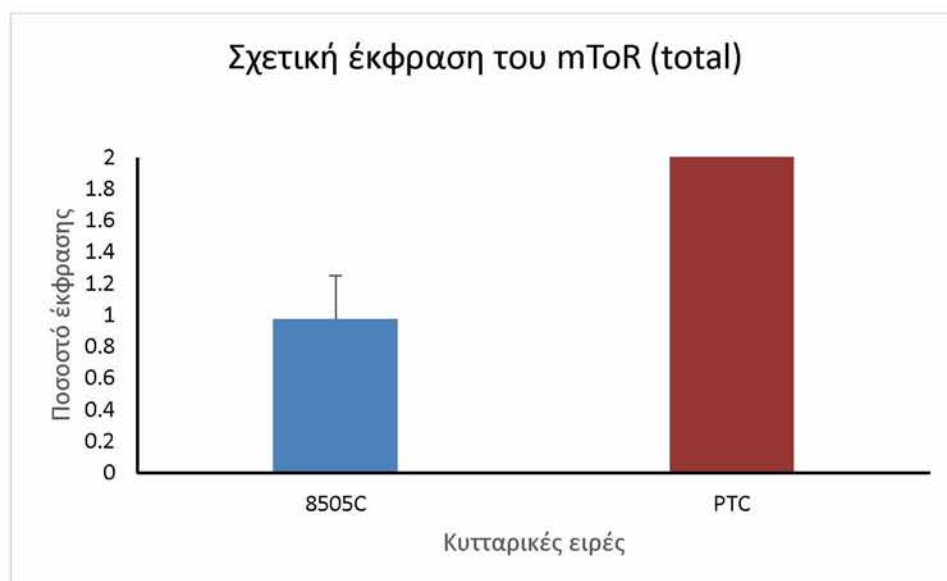
Εικόνα 10: Αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης για της πρωτεΐνες Phospho - mToR (ser 2448), mToR (total), Rictor, Raptor, Gβ1 και GAPDH για τις κυτταρικές σειρές 8505C και PTC



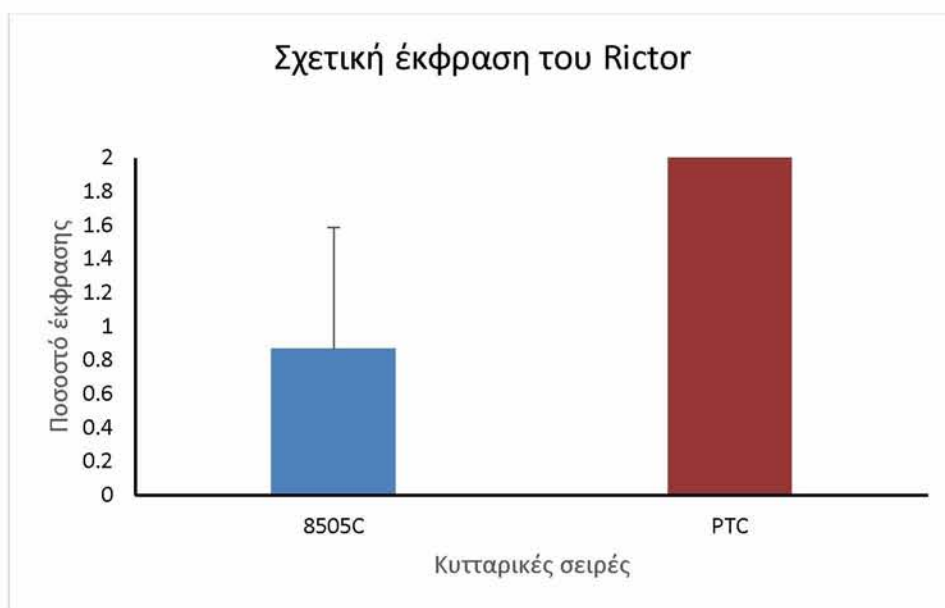
Από την παραπάνω εικόνα φαίνεται πως, οι πρωτεΐνες Phospho - mToR (ser 2448), mToR, Rictor και Raptor εκφράζονται και στις δύο κυτταρικές σειρές αν και η έκφραση τους φαίνεται να υπερτερεί στη κυτταρική σειρά PTC έναντι της κυτταρικής σειράς 8505C. Όσον αφορά την πρωτεΐνη Gβ1, τα επίπεδα έκφρασης της μεταξύ των δύο κυτταρικών σειρών είναι ίδια. Πιο συγκεκριμένα, από την κανονικοποίηση προέκυψαν τα εξής αποτελέσματα:



Γράφημα 1: Σχετική έκφραση του phospho-mToR (ser-2448) στις κυτταρικές σειρές 8505C και PTC. Τιμή 8505C: 1.22 Τιμή PTC: 1.6 Τυπική απόκλιση 8505C:0.61 Τυπική απόκλιση PTC:0.16

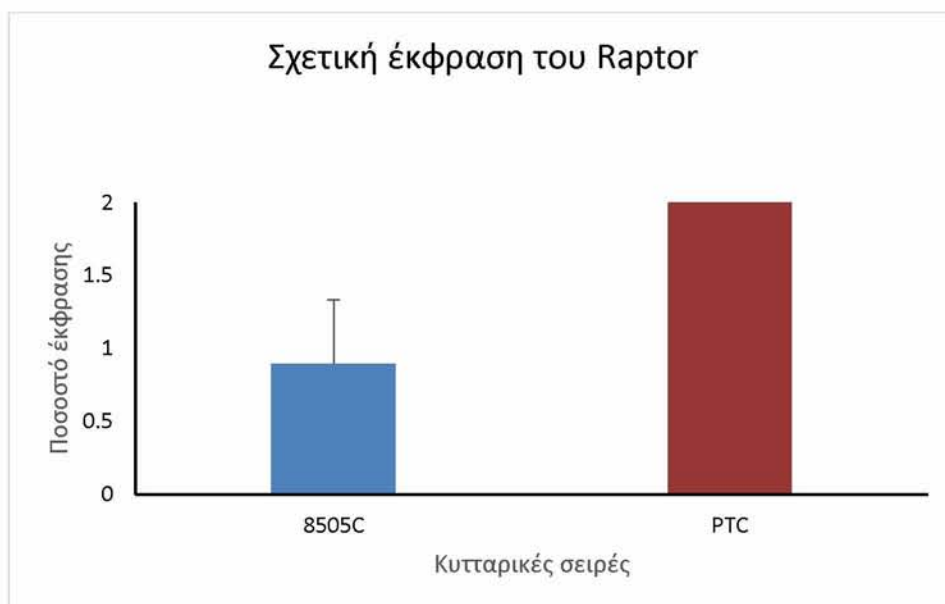


Γράφημα 2: Σχετική έκφραση του mToR (total) στις κυτταρικές σειρές 8505C και PTC. Τιμή 8505C: 0.97 Τιμή PTC: 2.11 Τυπική απόκλιση 8505C:0.27 Τυπική απόκλιση PTC:0.42



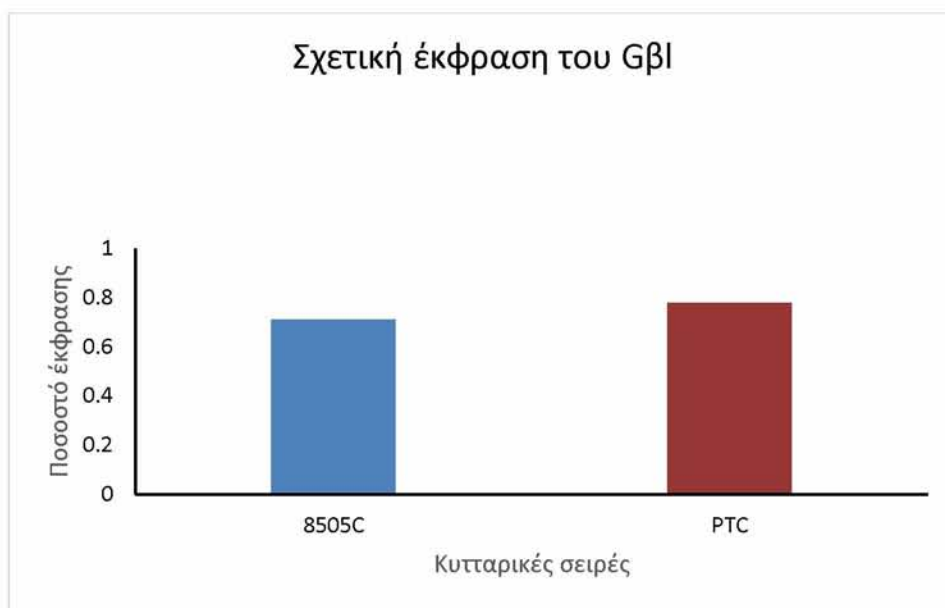
Γράφημα 3: Σχετική έκφραση του Rictor στις κυτταρικές σειρές 8505C και PTC.

Τιμή 8505C: 0.86 Τιμή PTC: 2.09 Τυπική απόκλιση 8505C:0.71 Τυπική απόκλιση PTC:0.35



Γράφημα 4: Σχετική έκφραση του Raptor στις κυτταρικές σειρές 8505C και PTC.

Τιμή 8505C: 0.89 Τιμή PTC: 2.75 Τυπική απόκλιση 8505C:0.43 Τυπική απόκλιση PTC:0.61



Γράφημα 5: Σχετική έκφραση του GβI στις κυτταρικές σειρές 8505C και PTC.

Τιμή 8505C: 0.71 Τιμή PTC: 0.77

	8505C	PTC
<u>Phospho-mTOR (ser2448)</u>	1	1,31
<u>mTOR (total)</u>	1	2.17
<u>Rictor</u>	1	2.43
<u>Raptor</u>	1	3.09
<u>GβL</u>	1	1.08

Πίνακας 5: Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων για τις κυτταρικές σειρές 8505C και PTC.

Στο πίνακα καταγράφεται η αναλογία των δύο κυτταρικών σειρών για τις πρωτεΐνες που μελετήθηκαν.

## Z. Συζήτηση

Ο έλεγχος της κυτταροτοξικότητας πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικές κατηγορίες αναστολέων, τους αναστολείς πρώτης γενιάς και τους αναστολείς δεύτερης γενιάς. Οι αναστολείς πρώτης γενιάς έχουν ως βάση την καταστολή του συμπλόκου mTORC1 αλλά δεν έχουν τη δυνατότητα να καταστείλουν τη λειτουργία του mTORC2. Αρχικά συνδέονται με τη πρωτεΐνη FKBP12 και το σύμπλοκο αναστολέα-FKBP12 εμποδίζει τη λειτουργία του συμπλόκου mTORC1. Οι αναστολείς δεύτερης γενιάς έχουν τη δυνατότητα να συνδέονται και να καταστέλλουν τόσο τη λειτουργία του συμπλόκου mTORC1 όσο και του mTORC2.

Από τον έλεγχο της κυτταροτοξικότητας προέκυψε ότι, τόσο για την κυτταρική σειρά 8505C όσο και για την PTC, το Temsirolimus παρουσιάζει τη μικρότερη GI50, TGI και LC50 για τους αναστολείς πρώτης γενιάς. Όσον αφορά τους αναστολείς δεύτερης γενιάς, το AZD8055 παρουσιάζει τη μικρότερη GI50, TGI και LC50 τόσο για τη σειρά 8505C όσο και για τη PTC (με εξαίρεση το LC50 της PTC όπου το XL388 παρουσιάζει τη μικρότερη συγκέντρωση).

Τα αποτελέσματα του ελέγχου κυτταροτοξικότητας έδειξαν επίσης πως, οι αναστολείς δεύτερης γενιάς έχουν μικρότερη GI50 (ελάχιστη συγκέντρωση για την αναστολή της ανάπτυξης του 50% των κυττάρων) συγκρινόμενοι με τους αναστολείς πρώτης γενιάς, εξαιρεμένου του Temsirolimus. Το γεγονός αυτό μπορεί να θεωρηθεί φυσιολογικό, καθώς οι αναστολείς δεύτερης γενιάς αναστέλλουν και τα δύο σύμπλοκα mTOR (mTORC1 και mTORC2), αναστέλλοντας σε μεγαλύτερο βαθμό την ανάπτυξη των κυττάρων συγκρινόμενοι με τους αναστολείς πρώτης γενιάς. Επίσης, τα αποτελέσματα του ελέγχου κυτταροτοξικότητας έδειξαν πως, οι αναστολείς δεύτερης γενιάς έχουν μεγαλύτερη LC50 (απαιτούμενη συγκέντρωση για τη θανάτωση του 50% των κυττάρων) συγκρινόμενοι με τους αναστολείς πρώτης γενιάς.

Τα παραπάνω αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα πως, οι αναστολείς δεύτερης γενιάς έχουν πολύ μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στην αναστολή της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων του θυροειδούς (χαμηλότερη συγκέντρωση GI50) συγκρινόμενοι με τους αναστολείς πρώτης γενιάς. Επιπλέον οι αναστολείς δεύτερης γενιάς παρουσιάζουν πολύ χαμηλότερη τοξικότητα (καθώς έχουν μεγαλύτερο LC50) συγκρινόμενοι με τους αναστολείς πρώτης γενιάς. Από την σύγκριση των έξι αναστολέων, το AZD8055 παρουσιάζει τον υψηλότερο

θεραπευτικό δείκτη ενώ το Everolimus παρουσιάζει τον χαμηλότερο θεραπευτικό δείκτη (θεραπευτικός δείκτης – Therapeutic Index = LC50/GI50). Αν και το AZD8055 παρουσιάζει τον υψηλότερο θεραπευτικό δείκτη, αξίζει να σημειωθεί πως, όλοι οι αναστολείς εμφανίζουν γενικά αξιόλογη δραστικότητα, οι οποίοι θα πρέπει να διερευνηθούν με περαιτέρω πειράματα.

Συγκρίνοντας την δραστικότητα των αναστολέων μεταξύ των δύο κυτταρικών σειρών, φαίνεται πως η κυτταρική σειρά PTC παρουσιάζει μεγαλύτερη ανθεκτικότητα από τη κυτταρική σειρά 8505C. Τόσο για την GI50, όσο και για τη TGI, γίνεται αντιληπτό πως, η απαραίτητη συγκέντρωση είναι πολύ μεγαλύτερη στη κυτταρική σειρά PTC συγκρινόμενη με την αντίστοιχη συγκέντρωση για τη κυτταρική σειρά 8505C (με εξαίρεση την TGI του XL388). Για την LC50, τα αποτελέσματα είναι πιο περίπλοκα καθώς ενώ για τους αναστολείς πρώτης γενιάς, η κυτταρική σειρά PTC απαιτεί μεγαλύτερη συγκέντρωση συγκρινόμενη με τη κυτταρική σειρά 8505C αλλά τα αποτελέσματα είναι αντίθετα για τη LC50 των αναστολέων δεύτερης γενιάς καθώς η απαραίτητη συγκέντρωση είναι μεγαλύτερη στη κυτταρική σειρά 8505C. Σε γενικές γραμμές, η κυτταρική σειρά PTC παρουσιάζει μεγαλύτερη ανθεκτικότητα από την κυτταρική σειρά 8505C σε όλους τους τομείς (εκτός από την LC50 των αναστολέων δεύτερης γενιάς).

Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, η κινάση mTOR (κινάση σερίνης/θρεονίνης) έχει κυρίαρχο ρόλο στο μονοπάτι σηματοδότησης PI3K – Akt. Η ενεργοποίηση της, μέσω της φωσφορυλίωσης σε συγκεκριμένες θέσεις, μπορεί να αυξήσει το ρυθμό αντιγραφής του DNA των κυττάρων. Η λειτουργικότητα της mTOR εξαρτάται άμεσα από την πρόσδεση της σε συγκεκριμένες πρωτεΐνες. Η mTOR μπορεί να συμμετέχει σε δύο διαφορετικά σύμπλοκα: το mTORC1 και το mTORC2. Το σύμπλοκο mTORC1 αποτελείται από τις πρωτεΐνες mTOR, Raptor, MLST8 (Gβ1) και PRAS40. Το mTORC2 σύμπλοκο αποτελείται από τις πρωτεΐνες mTOR, Rictor, Sin 1 και mLST8. Και τα δύο σύμπλοκα είναι απαραίτητα για την λειτουργικότητα του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3k – Akt. Το σύμπλοκο mTORC2 φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί το Akt στη σερίνη 473. Το ενεργοποιημένο Akt οδηγεί στην ενεργοποίηση του mTORC1, φωσφορυλιώνοντας το mTOR στη σερίνη 2448 (Navé et al, 1999).

Τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης έδειξαν ότι, οι πρωτεΐνες mTOR, phospho-mTOR (ser2448), Rictor και Raptor εκφράζονται σε μεγαλύτερο βαθμό στη κυτταρική σειρά PTC (Papillary Thyroid Cancer) συγκρινόμενες με την κυτταρική

σειρά 8505C (αδιαφοροποίητο καρκίνωμα), όπως φαίνεται στο πίνακα 5. Ένα εύλογο συμπέρασμα είναι πως, τα κύτταρα της κυτταρικής σειράς PTC σχηματίζουν έναν αρκετά μεγαλύτερο αριθμό συμπλόκων mTORC1 και mTORC2 σε σύγκριση με τα κύτταρα τις κυτταρικής σειράς 8505C.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας ενισχύονται από τα δεδομένα των Moraitis et al (2014). Οι Moraitis et al έδειξαν με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης πως, τα επίπεδα εμφάνισης της πρωτεΐνης SIN1 (πρωτεΐνη του συμπλόκου mTORC2) και της φωσφορυλιωμένης μορφής της πρωτεΐνης Akt στη σερίνη 473 (pAkt-ser473) είναι πολύ μεγαλύτερα στα κύτταρα της επιθετικής κυτταρικής σειράς PTC (aPTC) συγκρινόμενα με τα επίπεδα αναπλαστικού καρκινώματος (ATC). Επιπλέον, μία νέα έρευνα υποδηλώνει πως, τα αυξημένα επίπεδα της phospho-mToR στη ser2448 μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτης επιθετικότητας του θηλώδους καρκινώματος του θυρεοειδούς (Tavares et al, 2016). Χρησιμοποιώντας τα δεδομένα των τριών εργασιών μπορεί να γίνει κατανοητό το εξής: Καθώς στα κύτταρα της σειράς PTC σχηματίζονται περισσότερα σύμπλοκα mTORC2, φωσφορυλιώνονται και ενεργοποιούνται περισσότερες πρωτεΐνες Akt στη σερίνη 473. Οι πρωτεΐνες αυτές, με τη σειρά τους, φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν περισσότερα σύμπλοκα mTORC1. Καθώς τα σύμπλοκα mTORC1 είναι υπεύθυνο για:

- την έκφραση απαραίτητων πρωτεϊνών για την αντιγραφή του κυττάρου
- το σχηματισμό του μεταφραστικού συμπλόκου
- την υπερκέραση του φραγμού της παύσης μεταξύ της κυτταρικής φάσης G1-S (G1/S transition phase) γίνεται κατανοητό πως το δυναμικό της αντιγραφής των κυττάρων της σειράς PTC είναι αρκετά μεγαλύτερο από το αντίστοιχο δυναμικό της σειράς 8505C.

Επιπλέον, από την σχετική ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων βρέθηκε πως τα επίπεδα έκφρασης του Raptor είναι μεγαλύτερα από τα επίπεδα έκφρασης του Rictor. Αυτό θα μπορούσε να υποδηλώνει πως, και στις 2 κυτταρικές σειρές παρατηρείται μεγαλύτερος αριθμός συμπλόκων mTORC1 σε σχέση με τα σύμπλοκα mTORC2.

Τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης έδειξαν λοιπόν πως, τα κύτταρα της κυτταρικής σειράς PTC σχηματίζουν έναν αρκετά μεγαλύτερο αριθμό συμπλόκων mTORC1 και mTORC2. Τόσο οι αναστολείς πρώτης γενιάς, όσο και οι αναστολείς δεύτερης γενιάς, είναι υπεύθυνοι για την αναστολή της πρωτεΐνης mToR. Καθώς στη κυτταρική σειρά PTC υπάρχουν περισσότερα σύμπλοκα mToR, είναι λογικό πως, με

την ίδια δόση αναστολέα, το ποσοστό των συμπλόκων που θα ανασταλούν είναι μικρότερο όταν αυτό συγκρίνεται με τη κυτταρική σειρά 8505C. Καθώς τα σύμπλοκα mTOR είναι υπεύθυνα για την αντιγραφή του κυττάρου, είναι λογικό πως, χορηγώντας την ίδια δόση αναστολέα, η κυτταρική σειρά PTC παρουσιάζει μεγαλύτερη ανθεκτικότητα ως προς την αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων όταν αυτή συγκρίνεται με τη κυτταρική σειρά 8505C.

Ως εκ τούτου τα αποτελέσματα της κυτταροτοξικότητας των αναστολέων που δείχνουν ότι τα κύτταρα PTC είναι πιο ανθεκτικά από τα 8505C συνάδουν με τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης που δείχνουν διαφορετική έκφραση και ενεργοποίηση των δύο συμπλόκων της mTOR.

Καταλήγοντας, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι, η στόχευση της mTOR μπορεί να αναστείλει σημαντικά την αύξηση των καρκινικών κυττάρων του θυρεοειδούς ιδιαίτερα δε όταν γίνεται διπλή στόχευση των δυο συμπλόκων της κινάσης (αναστολείς δεύτερης γενιάς). Βεβαίως, τα αποτελέσματα αυτά πραγματοποιήθηκαν σε δύο μόνο κυτταρικές σειρές και σε *in vitro* συνθήκες. Για την καλύτερη κατανόηση του μηχανισμού των αναστολέων ως προς τον καρκίνο του θυρεοειδούς αλλά και τη σαφή επιβεβαίωση της αποτελεσματικότητάς τους, απαιτείται η διεξαγωγή μίας σειράς πειραμάτων και σε άλλες κυτταρικές σειρές όπως επίσης και η διεξαγωγή πειραμάτων *in vivo* σε ζωικά πρότυπα καρκίνου.

## H. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Alexiou C, Tietze R, Schreiber E, Jurgens R, Richter H, Trahm L, Rahnd H, Odenbach S, Lyera S. Cancer therapy with drug loaded magnetic nanoparticles-magnetic drug targeting. *J Magn Magn Mater* 2011;323:1404-1407
2. Altomare D, Khaled A. Homeostasis and the Importance for a Balance Between AKT/mTOR Activity and Intracellular Signaling. *Curr Med Chem*. 2012;19(22):3748-62
3. Antonelli A, Fallahi P, Ferrari S, Ruffilli I, Santini F, Minuto M, Galleri D, Miccoli P. New Targeted Therapies for Thyroid Cancer. *Current Genomics* 2011;12:626-631
4. Barbet N, Schneider U, Helliwell S, Stansfield I, Tuite M, Hall M. TOR controls translation initiation and early G1 progression in yeast. *Mol Biol Cell*. 1996;7(1):25-42
5. Basu B, Dean E, Puglisi M, Greystoke A, Ong M, Burke W, Cavallin M, Bigley G, Womack C, Harrington E, Green S, Oelmann E, de Bono J, Ranson M, Banerji U. First-in-human pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the dual m-TORC 1/2 inhibitor, AZD2014. *Clin Cancer Res*. 2015;21(15):3412-9
6. Boron, W.; Boulapep, E. *Medical Physiology* (2nd ed.). 2012.
7. Charest A, Lane K, McMahon K, Park J, Preisinger E, Conroy H, Housman D. Fusion of FIG to the Receptor Tyrosine Kinase ROS in a Glioblastoma with an Interstitial del(6)(q21q21). *Genes, Chromosomes and Cancer* 2003;37(1):58-71
8. Chiang G, Abraham R. Phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR) at Ser-2448 is mediated by p70S6 kinase. *J Biol Chem*. 2005;280(27):25485-90
9. Chiang G, Abraham R. Targeting the mTOR signaling network in cancer. *Trends Mol Med*. 2007;13(10):433-42.
10. Chresta C, Davies B, Hickson I, Harding T, Cosulich S, Critchlow S, Vincent J, Ellston R, Jones D, Sini P, James D, Howard Z, Dudley P, Hughes G, Smith L, Maguire S, Hummersone M, Malagu K, Menear K, Jenkins R, Jacobsen M, Smith G, Guichard S, Pass M. AZD8055 is a potent, selective, and orally



- bioavailable ATP-competitive mammalian target of rapamycin kinase inhibitor with in vitro and in vivo antitumor activity. *Cancer Res.* 2010;70(1):288-98.
11. Cummings C, et al. Thyroid anatomy. *Cummings Otolaryngology - Head and Neck Surgery*. 3rd 1998;2445-49.
  12. Dennis P, Jaeschke A, Saitoh M, Fowler B, Kozma S, Thomas G. Mammalian TOR: a homeostatic ATP sensor. *Science*. 2001;294(5544):1102-5
  13. Dörr J, Yu Y, Milanovic M, Beuster G, Zasada C, et al. Synthetic lethal metabolic targeting of cellular senescence in cancer therapy. *Nature* 2013;501: 421-425
  14. Feldman M, Apse B, Uotila A, Loewith R, Knight Z, Ruggero D, Shokat K. Active-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2. *PLoS Biol.* 2009; 7(2): e1000038.
  15. García-Echeverría C. Allosteric and ATP-competitive kinase inhibitors of mTOR for cancer treatment. *Bioorg Med Chem Lett.* 2010;20(15):4308-12
  16. Gingras A, Raught B, Sonenberg N. Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev.* 2001;15(7):807-26
  17. Gingras A, Raught B, Sonenberg N. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem.* 1999;68:913-63
  18. Guichard S, Curwen J, Bihani T, D'Cruz C, Yates J, Grondine M, Howard Z, Davies B, Bigley G, Klinowska T, Pike K, Pass M, Chresta C, Polanska U, McEwen R, Delpuech O, Green S, Cosulich S. AZD2014, an Inhibitor of mTORC1 and mTORC2, Is Highly Effective in ER+ Breast Cancer When Administered Using Intermittent or Continuous Schedules. *Mol Cancer Ther.* 2015;14(11):2508-18
  19. Hajdu S. A Note From History: Landmarks in History of Cancer, Part 1. *Cancer* 2011;117(5):1097-102
  20. Hanahan D, Weinberg R. Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
  21. Hanahan D, Weinberg R. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 2011;144(5):646-74
  22. Harris T, Lawrence J. ToR signaling. *Sci STKE*. 2003;(212):re15
  23. Hermant K, Raizaday A, Kasina S. New Therapeutic Approaches in Treating Cancer. *Pharmaceut Reg Affairs* 2014;3:5

24. Holz M, Blenis J. Identification of S6 kinase 1 as a novel mammalian target of rapamycin (mTOR)-phosphorylating kinase. *The Journal of Biological Chemistry* 2005;280(28):26089-93
25. Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Rüegg M, Hall A, Hall M. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol.* 2004;6(11):1122-8
26. Jefferies H, Fumagalli S, Dennis P, Reinhard C, Pearson R, Thomas G. Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k. *EMBO J.* 1997;16(12):3693-704
27. Kouvaraki M, Liakou C, Paraschi A, Dimas K, Patsouris E, Tseleni-Balafouta S, Rassidakis G, Moraitis D. Activation of mTOR signaling in medullary and aggressive papillary thyroid carcinomas. *Surgery.* 2011;150(6):1258-65
28. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227: 680-685.
29. Liu Z, Hou P, Ji M, Guan H, Studeman K, Jensen K, Vasko V, El-Naggar A, Xing M. Highly prevalent genetic alterations in receptor tyrosine kinases and phosphatidylinositol 3-kinase/akt and mitogen-activated protein kinase pathways in anaplastic and follicular thyroid cancers. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(8):3106-16
30. Mackey J, Kerbel R, Gelmon K, McLeod D, Chia S, Rayson D, Verma S, Collins L, Paterson A, Robidoux A, Pritchard K. Controlling angiogenesis in breast cancer: a systematic review of anti-angiogenic trials. *Cancer Treat Rev.* 2012;38(6):673-88.
31. Marotta V, Sciammarella C, Vitale M, Colao A, Faggiano A. The evolving field of kinase inhibitors in thyroid cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2015;93(1):60-73
32. Mita M, Mita A, Rowinsky E. Mammalian Target of Rapamycin: A New Molecular Target for Breast Cancer. *Clin Breast Cancer.* 2003;4(2):126-37.
33. Moraitis D, Karanikou M, Liakou C, Dimas K, Tzimas G, Tseleni-Balafouta S, Patsouris E, Rassidakis G, Kouvaraki M. SIN1, a critical component of the mTOR-Rictor complex, is overexpressed and associated with AKT activation in medullary and aggressive papillary thyroid carcinomas. *Surgery* 2014;156(6):1542-8; discussion 1548-9

34. Navé B, Ouwers M, Withers D, Alessi D, Shepherd P. Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. *Biochem J.* 1999;344 Pt 2:427-31
35. Nicholson K, Anderson N. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal.* 2002;14(5):381-95
36. Paes J, Ringel M. Dysregulation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in thyroid neoplasia. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2008;37(2):375-87
37. Phelan M. Basic Techniques for Mammalian Cell Tissue Culture. *Curr Protoc Cell Biol.* 2007;Chapter 1:Unit 1.1
38. Pesonen S, Kangasniemi L, Hemminki A. Oncolytic adenoviruses for the treatment of human cancer: focus on translational and clinical data. *Mol Pharm* 2011;8:12-28.
39. Rasool M, Naseer M, Zaigham K., Malik A, Riaz N, Alam R., Manan A, Sheikh I, Asif M. Comparative Study of Alterations in Tri-iodothyronine (T3) and Thyroxine (T4) Hormone Levels in Breast and Ovarian Cancer. *Pak J Med Sci.* 2014; 30(6): 1356–1360.
40. Raynaud F, Eccles S, Patel S, Alix S, Box G, Chuckowree I, Folkes A, Gowan S, De Haven Brandon A, Di Stefano F, Hayes A, Henley A, Lensun L, Pergl-Wilson G, Robson A, Saghir N, Zhyvoloup A, McDonald E, Sheldrake P, Shuttleworth S, Valenti M, Wan N, Clarke P, Workman P. Biological properties of potent inhibitors of class I phosphatidylinositide 3-kinases: from PI-103 through PI-540, PI-620 to the oral agent GDC-0941. *Mol Cancer Ther.* 2009;8(7):1725-38
41. Saji M, Ringel M. The PI3K-Akt-mTOR pathway in initiation and progression of thyroid tumors. *Mol Cell Endocrinol* 2010;321(1):20-8.
42. Sansal I, Sellers W. The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway. *J Clin Oncol.* 2004;22(14):2954-63
43. Sarbassov D, Ali S, Sengupta S, Sheen J, Hsu P, Bagley A, Markhard A, Sabatini D. Prolonged Rapamycin Treatment Inhibits mTORC2 Assembly and Akt/PKB. *Mol Cell.* 2006;22(2):159-68
44. Sarbassov D, Guertin D, Ali S, Sabatini D. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science.* 2005;307(5712):1098-101

45. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000;182(3):311-22
46. Scott A, Wolchok J, Old L. Antibody therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* 2012;12:278-287
47. Souza E, Ferreira A, Carvalho D. The mTOR protein as a target in thyroid cancer. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 2011;15(9):1099-112
48. Stewart B, Wild C. *World Cancer Report* 2014
49. Strimpakos A, Karapanagiotou E, Saif M, Syrigos K. The role of mTOR in the management of solid tumors: An overview. *Cancer Treat Rev.* 2009;35(2):148-59
50. Takano A, Usui I, Haruta T, Kawahara J, Uno T, Iwata M, Kobayashi M. Mammalian target of rapamycin pathway regulates insulin signaling via subcellular redistribution of insulin receptor substrate 1 and integrates nutritional signals and metabolic signals of insulin. *Mol Cell Biol.* 2001;21(15):5050-62
51. Takeuchi K, Choi Y, Togashi Y, Soda M, Hatano S, Inamura K, Takada S, Ueno T, Yamashita Y, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Ishikawa Y, Mano H. KIF5B-ALK, a novel fusion oncokinase identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15(9):3143-9
52. Takeuchi C, Kim B, Blazey C, Ma S, Johnson H, Anand N, Arcalas A, Baik T, Buhr C, Cannoy J, Epshteyn S, Joshi A, Lara K, Lee M, Wang L, Leahy J, Nuss J, Aay N, Aoyama R, Foster P, Lee J, Lehoux I, Munagala N, Plonowski A, Rajan S, Woolfrey J, Yamaguchi K, Lamb P, Miller N. Discovery of a novel class of highly potent, selective, ATP-competitive, and orally bioavailable inhibitors of the mammalian target of rapamycin (mTOR). *J Med Chem.* 2013;56(6):2218-34
53. Tavares C, Coelho MJ, Melo M, da Rocha AG, Pestana A, Batista R, Salgado C, Eloy C, Ferreira L, Rios E, Sobrinho-Simões M, Soares P. pmTOR is a marker of aggressiveness in papillary thyroid carcinomas. *Surgery.* 2016.pii:S0039-6060(16)30347-6.
54. Thomas G. The S6 kinase signaling Pathway in the control of Development and Growth. *Biol Res.* 2002;35(2):305-13

55. Viola D, Elisei R. Tyrosine Kinase Inhibitors for the Treatment of Thyroid Cancer: Present and Future. *Endocrinol Metab Int J* 2015;2(4):00026
56. Wan X, Harkavy B, Shen N, Grohar P, Helman L. Rapamycin induces feedback activation of Akt signaling through an IGF-1R-dependent mechanism. *Oncogene* 2007;26(13):1932-40
57. Workman P, Clarke P, Raynaud F, van Montfort R. Drugging the PI3 kinome: from chemical tools to drugs in the clinic. *Cancer Res.* 2010;70(6):2146-57
58. Wu G, Mambo E, Guo Z, Hu S, Huang X, Gollin S, Trink B, Ladenson P, Sidransky D, Xing M. Uncommon mutation, but common amplifications, of the PIK3CA gene in thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(8):4688-93
59. Yang Q, Guan K. Expanding mTOR signaling. *Cell Research* 2007;17(8):666-81.
60. Yuan T, Cantley L. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene.* 2008;27(41):5497-510
61. Zhang Y, Duan Y, Zheng X. Targeting the mTOR kinase domain: the second generation of mTOR inhibitors. *Drug Discov Today* 2011;16(7-8):325-31
62. Zhao L, Teng B, Wen L, Feng Q, Wang H, Li N, Wang Y, Liang Z. mTOR inhibitor AZD8055 inhibits proliferation and induces apoptosis in laryngeal carcinoma. *Int J Clin Exp Med.* 2014;7(2):337-47
63. Zou H, Li Q, Engstrom L, West M, Appleman V, Wong K, McTigue M, Deng Y, Liu W, Brooun A, Timofeevski S, McDonnell S, Jiang P, Falk M, Lappin P, Affolter T, Nichols T, Hu W, Lam J, Johnson T, Smeal T, Charest A, Fantin V. PF-06463922 is a potent and selective next-generation ROS1/ALK inhibitor capable of blocking crizotinib-resistant ROS1 mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(11):3493-8
64. <http://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/staging>
65. <http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/fda-everolimus>
66. <http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/fda-temsirolimus>
67. <http://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms>
68. [http://www.cancer.gov/types/thyroid/hp/thyroid-treatment-pdq#link/\\_1](http://www.cancer.gov/types/thyroid/hp/thyroid-treatment-pdq#link/_1)
69. <http://www.cancer.gov/images/cdr/live/CDR719086-750.jpg>
70. <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/thyro.html>
71. [https://dtp.cancer.gov/discovery\\_development/nci-60/methodology.htm](https://dtp.cancer.gov/discovery_development/nci-60/methodology.htm)

- 72. <http://www.cancer.org/cancer/thyroidcancer/detailedguide/thyroid-cancer-treating-general-info>
- 73. <http://www.cancer.org/cancer/thyroidcancer/detailedguide/thyroid-cancer-signs-symptoms>
- 74. [http://www.novusbio.com/GAPDH-Antibody-2D4A7\\_NB300-328H.html](http://www.novusbio.com/GAPDH-Antibody-2D4A7_NB300-328H.html)
- 75. <http://www.thyroidcancer.eu/en/symptoms>
- 76. <http://www.thyroidcancer.eu/en/symptoms-and-diagnosis/diagnosis>
- 77. <https://antisensescienceblog.wordpress.com/2014/07/17/hallmarks-of-cancer/>
- 78. <http://www.celeromics.com/en/resources/Technical%20Notes/cells-chamber-concentration.php>